

**Untersuchungen zur selektiven Promotoraktivierung im
komplex regulierten Lokus der myogenen Faktoren
Mrf4 und Myf5**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von: Bastian Hatesuer

aus: Peine

1. Referent: Professor Dr. Hans-Henning Arnold

2. Referent: Professor Dr. Martin Korte

eingereicht am: 11.10.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.02.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, vorab veröffentlicht:

Buchberger, A. Hatesuer B., Arnold H.H.; Specific promoter selection by different enhancers within the Mrf4/Myf5 gene locus (Poster). 18. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Hannover 2009

für Finja

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Die Skelettmuskelentwicklung wird durch eine Familie myogener Transkriptionsfaktoren kontrolliert	3
1.2 Der myogene Transkriptionsfaktor <i>Myf5</i> zeigt hoch komplexe transkriptionelle Regulation	6
1.3 Der Early Epaxial Enhancer ist für die initiale <i>Myf5</i> -Expression in den Somiten verantwortlich	7
1.4 Der distale -58/-56 kb Enhancer kontrolliert <i>Myf5</i> -Expression in Somiten und Extremitäten	8
1.5 Die Spezifität von Promotor-Enhancer Interaktionen kann durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden.....	9
1.6 Zielsetzung	14
2 MATERIAL.....	15
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.2 verwendete Kits.....	15
2.3 Puffer und Stammlösungen	15
2.4 Radiochemikalien	16
2.5 Antibiotika	16

Inhaltsverzeichnis

2.6	Enzyme	16
2.7	Bakterienstämme.....	17
2.8	Mausstämme.....	17
2.9	Eukaryontische Zelllinien	17
2.10	Vektoren	17
2.11	Oligonukleotide.....	18
2.11.1	Genotypisierungsprimer	18
2.11.2	Sequenzierungsprimer.....	18
2.11.3	Primer für das Chromosome Conformation Capture	19
2.11.4	5´ RACE Primer	20
2.11.5	sonstige Oligonukleotide	20
2.12	Hergestellte Konstrukte.....	21
2.13	Geräte	26
2.14	Online Datenbanken und Computerprogramme.....	28
3	METHODEN.....	29
3.1	Arbeiten mit DNA	29
3.1.1	Lagerung	29
3.1.2	Enzymatische Modifikationen von DNA	29
3.1.3	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	30
3.1.4	Hybridisierung von Oligonukleotiden	30
3.1.5	Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP....	30
3.1.6	Standard-PCR	31
3.1.7	Sequenzierung.....	32
3.1.8	Acrylamid Gelelektrophorese	33
3.1.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen.....	34
3.2	Arbeiten mit RNA	35
3.2.1	Lagerung	35
3.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe.....	35

3.2.3	5´ RACE-PCR (5´ <i>rapid amplification of cDNA ends</i>)	35
3.3	Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien	37
3.3.1	Transfektion	37
3.4	Herstellung transgener Mäuse	38
3.4.1	Aufarbeitung der zu injizierenden DNA	38
3.4.2	Superovulation von Mäusen.....	38
3.4.3	Isolation der befruchteten Eizellen	39
3.4.4	Mikroinjektion der DNA und Transfer der Eizellen	39
3.5	Analyse transgener Mäuse	40
3.5.1	Präparation von Embryonen und Gewebe.....	40
3.5.2	Histochemische Färbemethoden.....	40
3.5.3	Vibratomschnitte	41
3.6	Nachweis von Chromatin-Interaktionen über Chromosome Conformation Capture.....	42
3.6.1	Herstellung eines 3C-Templates aus murinem Gewebe	42
3.6.2	Herstellung eines 3C-Kontroll Templates und Normalisierung der Primer-Effizienz	44
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Untersuchungen zur Selektivität des <i>Myf5</i> -spezifischen Early Epaxial Enhancers	50
4.1.1	Das Muster der frühen myotomalen <i>Myf5</i> - und <i>Mrf4</i> -Expression kann durch ein transgenes Konstrukt rekonstruiert werden	50
4.1.2	Ein 3 kb <i>Mrf4</i> -Promotor-Fragment ist für die selektive Promotoraktivierung des EEEs ausreichend	53
4.1.3	Ein Konstrukt mit 500 Nukleotiden des <i>Mrf4</i> -Promotors wird durch den EEE aktiviert.	56
4.1.4	Untersuchungen zur Strukturierung des <i>Mrf4</i> -Promotors	59
4.2	Die räumliche Organisation des <i>Mrf4/Myf5</i> -Genlokus während der Aktivierung durch den -58/-56 kb Enhancer in der Embryonalentwicklung der Maus	63

4.2.1	Erhöhung der Sensitivität der 3C-Reaktion für die Anwendung an heterogenem Zellgewebe	65
4.2.2	Die Kommunikation zwischen -58/-56 kb Enhancer und <i>Myf5</i> -Promotor erfolgt über direkte Interaktion beider Elemente	69
4.3	Untersuchungen zur Promotor-Selektivität des <i>Myf5</i> -spezifischen -58/-56 kb Enhancers	75
4.3.1	Der distale Enhancer zeigt in der Konkurrenz selektive Aktivierung des <i>Myf5</i> -Promotors	76
4.3.2	Der <i>Myf5</i> -Promotor und die intergenische Region sind nicht an der selektiven Promotoraktivierung des distalen Enhancers beteiligt	78
4.3.3	Deletion der <i>Mrf4</i> -proximalen Sequenz hebt die Selektivität des -58/-56 kb Enhancers auf	80
5	DISKUSSION	86
5.1	Aktivierung des <i>Myf5</i> -Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer resultiert in der Bildung von Chromatin-Schleifen und direkter Interaktion beider Elemente.	88
5.2	Die selektive Aktivierung des <i>Myf5</i> -Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer erfolgt durch Blockierung des <i>Mrf4</i> -Promotors	91
5.3	Die selektive Promotoraktivierung des frühen epaxialen Enhancers wird durch inhibierende Effekte im <i>Mrf4</i> -Promotor erzielt	96
	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	Anhang	117
	Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ci	Curie
DML	dorso–mediale Lippe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid–Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEE	Early Epaxial Enhancer
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
g	Gramm
HS	Heat Shock Gen (hsp70)
kb	KiloBase (= 1000 Basenpaare)
m	Milli [10^{-3}]
M	Molar
MRF	myogener Regulationsfaktor
mRNA	messenger RNA (Boten–RNA)
μ	mikro [10^{-6}]
n	nano [10^{-9}]
<i>p.c.</i>	post coitum
PTE	Promotor Tethering Element
PTS	Promotor Targeting Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RNAPII	RNA Polymerase II
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
TK	Thymin Kinase
U	Unit
u.a.	unter anderem
U/Min	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett

Zusammenfassung

Die Entwicklung der Skelettmuskulatur in Vertebraten wird durch vier bHLH Transkriptionsfaktoren, den myogenen Regulationsfaktoren (MRFs) kontrolliert. Zwei dieser MRFs, *Myf5* und *Mrf4*, sind auf Chromosom 10 in einem Abstand von 8 kb in derselben transkriptionellen Orientierung lokalisiert. Die komplexen Expressionsmuster dieser Gene werden durch verschiedene Enhancer, die über einen Bereich von 140 kb verteilt sind, reguliert, weshalb die Frage gestellt werden muss, wie solche Elemente die Koordination und Selektivität für die spezifische Aktivierung der Zielgene realisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mechanismen, die der selektiven Promotoraktivierung durch den distalen -58/-56 kb Enhancer, welcher *Myf5* u.a. in den Muskelvorläuferzellen der Extremitäten aktiviert, und den Early Epaxial Enhancer (EEE), der für frühe *Myf5* Expression im epaxialen Myotom zuständig ist, untersucht.

Es ist zudem wenig darüber bekannt, auf welche Weise distale Elemente wie der -58/-56 kb Enhancer die Regulation der Zielpromotoren realisieren. Direkte Interaktion zwischen distalem Enhancer und *Myf5*-Promotor konnte durch Anwendung des Chromosome Conformation Capturings in Muskelvorläuferzellen der Somiten und Extremitäten nachgewiesen werden, was zu einer Veränderung der chromosomalen Struktur und der Bildung von Chromatin-Schleifen führt. Solche Strukturen wurden spezifisch für *Myf5*-exprimierende Zellen nachgewiesen. Es erfolgen keine Co-Lokalisationen zwischen dem Enhancer und dem *Mrf4*-Promotor, wodurch die Selektivität des Enhancers auf molekularer Ebene belegt werden konnte.

Während der -58/-56 kb Enhancer in transgenen Einzelreporterkonstrukten gleichermaßen den *Mrf4*-Promotor und den *Myf5*-Promotor aktiviert, zeigt der Enhancer in Anwesenheit beider Promotoren selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors. Deletionen verschiedener Regionen des *Mrf4/Myf5*-Genlokus in transgenen Konstrukten kartierten ein Bereich stromaufwärts des *Mrf4*-Promotors, welcher für das selektive Verhalten des -58/-56 kb Enhancers verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass die Regulation unabhängig vom *Myf5*-Promotor erfolgt, da die Substitution des TATA-Box haltigen *Myf5*-Promotors durch den heterologen *Heat Shock*-Promotor die Selektivität weiterhin aufrechterhalten blieb. Ein Austausch des *Mrf4*-Promotors

durch den *Thymidin Kinase*-Promotor führte hingegen zum Verlust der Enhancer Selektivität.

Der EEE, der zwischen den Genen *Mrf4* und *Myf5* positioniert ist, vermittelt *Myf5*-Expression im dorsalen epaxialen Bereich junger Somiten. Der Enhancer zeigte spezifische Aktivierung des *Myf5*-Promotors, die unabhängig von der Position und Kompetition ist. Durch sukzessive Deletionen des Genlokus konnte ein regulatorischer Bereich innerhalb eines 3kb *Mrf4*-Promotorbereiches identifiziert werden, welcher durch Blockierung des *Mrf4*-Promotors die selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors ermöglicht.

Die Ergebnisse deuten für beide Enhancer auf eine Regulation durch blockierende Mechanismen am *Mrf4*-Promotor hin, die jedoch nicht mit den klassischen Eigenschaften von Insulatoren übereinstimmen und zu erklären sind.

1 Einleitung

Die Entwicklung eines multizellulären Organismus und die damit verbundene Differenzierung seiner Zellen ist ein hochkomplexer Prozess, der auf zeitlich und räumlich kontrollierter Regulation der Genaktivierung beruht. Das Expressionsmuster eines Gens wird dabei durch Promotor-Enhancer Interaktionen innerhalb des Lokus, der Verfügbarkeit entsprechender Transkriptionsfaktoren sowie den kinetischen Bedingungen von DNA/Protein Interaktionen bestimmt. Die Spezifität dieser Promotor-Enhancer Interaktionen spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn sich mehrere Gene mit ähnlichen Funktionen und/oder Expressionsmustern auf dem gleichen Lokus befinden. Das *Myf5* Gen ist Teil eines solch komplexen Genlokus, welcher sich über einen Bereich von 140 kb erstreckt und neben einer Vielzahl von Enhancern zwei weitere Gene, *Mrf4* und *Ptprq*, enthält. Es gehört zur Familie der myogenen Regulationsfaktoren (MRF) und steuert zusammen mit drei weiteren Mitgliedern die Entwicklung der Skelettmuskulatur. *Myf5* determiniert das Zellschicksal myogener Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung und wird durch zahlreiche, weit voneinander getrennt liegender Kontrollelemente reguliert. Die Aufklärung der Mechanismen, die der Spezifität von Enhancer-Promotor Interaktionen in diesem Lokus zu Grunde liegen hilft zu verstehen, wie das komplexe Expressionsmuster von diesem Determinierungsgen realisiert wird.

1.1 Die Skelettmuskelentwicklung wird durch eine Familie myogener Transkriptionsfaktoren kontrolliert

Die gesamte quergestreifte Muskulatur von Rumpf, Schwanz und Extremitäten vertebrater Embryonen leitet sich von Somiten ab. Somiten sind transiente paarige Blöcke epithelialer Zellen, die sich am cranialen Ende des präsomitischen Mesoderms abschnüren und in rostro-caudaler Richtung entwickeln (Christ und Ohrdal, 1995). In der Maus sind diese Strukturen erstmals am Embryonaltag 8 sichtbar. Bereits kurz nach ihrer Entstehung differenzieren Somiten in das ventrale Sklerotom und das dorsale Dermomyotom. Während aus dem Sklerotom in der späteren Entwicklung Knorpel und Knochen des axialen Skeletts hervor gehen, enthält das Dermomyotom die Vorläuferzellen der Dermis sowie der Skelettmuskelzellen des Rumpfes und der Extremitäten (Venters et al.,

1999; siehe Abb. 1.1).

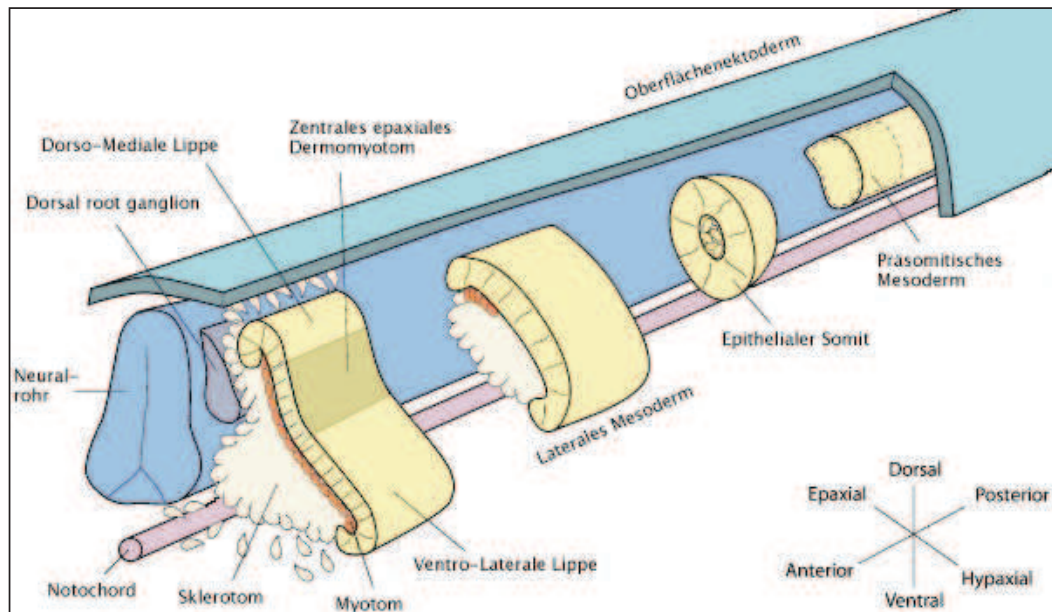


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Somitogenese in Vertebraten. Somiten bilden sich aus dem presomitischen Mesoderm und folgen einem rostrocaudalen Gradienten an beiden Seiten des Neuralrohrs. (Abbildung basierend auf Buckingham et al., 2003)

Im Laufe der Somiten-Reifung elongiert das Dermomyotom und segregiert Zellen im Bereich der dorso-medialen (DML) und ventro-lateralen Lippe (VLL) sowie der interkalierenden Region, welche unter das Dermomyotom wandern und das Myotom bilden (Brent und Tabin, 2002). Aus dem epaxialen Myotom entsteht die autochtone Rückenmuskulatur, während der hypaxiale Anteil des Myotoms die Vorläuferzellen der späteren Interkostal- und Abdominalmuskeln hervorbringt (Christ et al., 1983; Denetclaw et al., 1997; Christ und Brand-Saberi, 2002). Die Muskulatur der Extremitäten geht aus Zellen des hypaxialen Dermomyotoms hervor, die aus dem somitischen Verband delaminieren und in die Extremitäten einwandern (Christ and Ordahl, 1995; Buckingham et al., 2003).

Die Entwicklung der Skelettmuskulatur verläuft bei Vertebraten in mehreren Schritten: der Determinierung mesodermaler Vorläuferzellen zu Myoblasten, der Proliferation von Myoblasten, der Differenzierung zu Myotuben sowie der Reifung zu Muskelfasern. Der koordinierte Ablauf dieser Kaskade wird von einer Familie myogener bHLH (basic Helix-Loop-Helix) Transkriptionsfaktoren kontrolliert

(Arnold und Braun, 2000). Zu ihnen gehören *Myf5* (Braun et al., 1989), *Mrf4* (Rhodes und Konieczny, 1989; Braun et al., 1990; Miner und Wold, 1990), *MyoD* (Davis et al., 1987) und *Myogenin* (Edmondson und Olson, 1989; Wright et al., 1989). Die MRF-Proteine (Muskel Regulations Faktor) zeichnen sich durch eine konservierte bHLH-Domäne aus, die sequenzspezifische DNA-Bindung und Heterodimerisierung mit weiteren bHLH-Proteinen vermittelt. Bevorzugte Dimerisierungspartner sind die ubiquitär exprimierten Gene der E2A-Familie, mit denen die MRFs als transkriptionelle Aktivatoren agieren, indem sie an *cis*-regulierende Sequenzen, sog. E-Boxen (Konsensussequenz CANNTG), von skelettmuskelspezifischen Genen binden (Blackwell und Weintraub, 1990).

Die Funktion der einzelnen MRFs bei der Differenzierung von Skelettmuskeln wurde maßgeblich durch gezielte Inaktivierung der Gene in der Maus aufgeklärt. Danach sind *Myf5* und *MyoD* für Rekrutierung myogener Vorläuferzellen (Myoblasten) verantwortlich, während Myogenin zusammen mit *MyoD* die terminale Differenzierung von Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben einleiten (Braun et al., 1992; Rudnicki et al., 1992; Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993; Rudnicki et al., 1993; Venuti et al., 1995; Tajbakhsh et al., 1996; Rawls et al., 1998). *Mrf4* gilt als Differenzierungsfaktor, kann jedoch auch Determinierungsfunktion übernehmen (Braun und Arnold, 1995; Kassam-Duchossoy et al., 2004). Obwohl die Determinierung von Myoblasten durch mehrere MRFs vollzogen werden kann, wird *Myf5* aufgrund seiner frühen Expression an allen muskelbildenden Orten im Embryo, eine Schlüsselrolle zugesprochen (Tajbakhsh und Buckingham, 2000).

In der Maus ist *Myf5* am Tag 8 der Embryonalentwicklung (E 8,0) als erster der vier Transkriptionsfaktoren im dorsomedialen Sektor neu gebildeter Somiten nachweisbar. In weiter differenzierten Somiten findet man Transkripte im epaxialen Myotom und ab E 9,5 setzt die Expression auch im ventralen Dermomyotom und den Kiemenbögen ein (Ott et al., 1991; Tajbakhsh et al., 1996).

Die Myoblasten der Extremitätenmuskulatur, die aus migrierenden Zellen des hypaxialen Dermomyotoms stammen, zeigen *Myf5*-Expression ab Embryonaltag E 10,5. Während der Migration erfolgt keine *Myf5*-Expression. Diese wird durch die Transkriptionsfaktoren *Pax3* und *Lbx1* und dem c-met/HGF Signalweg gesteuert (Tajbakhsh et al., 1997; Dietrich et al., 1999; Schäfer und Braun, 1999). Während der Fusionierung zu mehrkernigen Myotuben bleibt *Myf5* aktiv

und wird beginnend mit der späten Embryonalphase (E13,5) herunter reguliert. Im adulten Tier beschränkt sich die Expression auf ruhende Satellitenzellen und Muskelspindeln (Beauchamp et al., 2000; Zammit et al. 2004).

1.2 Der myogene Transkriptionsfaktor *Myf5* zeigt hoch komplexe transkriptionelle Regulation

In allen Vertebraten ist *Myf5* in enger Nachbarschaft mit *Mrf4* auf einem Chromosom lokalisiert. In der Maus befinden sich beide Gene, nur 8,7 kb voneinander getrennt, auf Chromosom 10 und weisen die gleiche transkriptionelle Orientierung auf (Abb. 1.2). Die transkriptionelle Kontrolle von *Myf5* in den verschiedenen muskelbildenden Regionen wurde in den letzten Jahren unter Verwendung von BAC- (Bacterial Artificial Chromosom) und YAC-Reporterkonstrukten (Yeast Artificial Chromosom) in transgenen Mäusen untersucht (Zweigerdt et al., 1997; Hadchouel et al., 2000; Summerbell et al., 2000; Carvajal et al., 2001). Mit einem BAC, der Bereiche 195 kb stromaufwärts und 40 kb stromabwärts des *Myf5*-Transkriptionsstarts einschließt (BAC195APZ, Carvajal et al., 2001), konnte das gesamte embryonale und adulte Expressionsmuster rekapituliert werden. Durch sukzessive Deletionen dieses BAC-Klons, die mit dem Verlust einzelner Expressionsdomänen einhergingen, konnte die hohe Komplexität der transkriptionellen Regulation von *Myf5* offen gelegt werden. Kontrollregionen konnten über einen Bereich von 140 kb innerhalb des genetischen Lokus kartiert werden (BAC140APZ, Carvajal et al., 2001; siehe Abb. 1.2).

In der intergenischen Region zwischen *Mrf4* und *Myf5* befinden sich regulatorische Elemente für die *Myf5*-Expression in Kiemenbögen und dem epaxialen Anteil früher, neu gebildeter Somiten (Summerbell et al., 2000). Innerhalb des *Myf5* Gens selbst ist ein Enhancer lokalisiert, der zur Aktivierung im hypaxialen Dermomyotom beiträgt (Summerbell et al., 2000). Zahlreiche weitere Kontrollregionen befinden sich in genomischen Bereichen stromaufwärts der beiden Gene *Mrf4* und *Myf5*. Der Sequenzbereich zwischen -58 kb und -56 kb treibt *Myf5* in den Extremitäten, im Myotom der Somiten und im hypoglossalen Strang (Hadchouel et al., 2000; Buchberger et al., 2003). Für die adulte Expression in Satellitenzellen und Muskelspindeln sind die Regionen -140 kb bis -88 kb bzw. -59 kb bis -8.8 kb verantwortlich (Zammit et al., 2004).

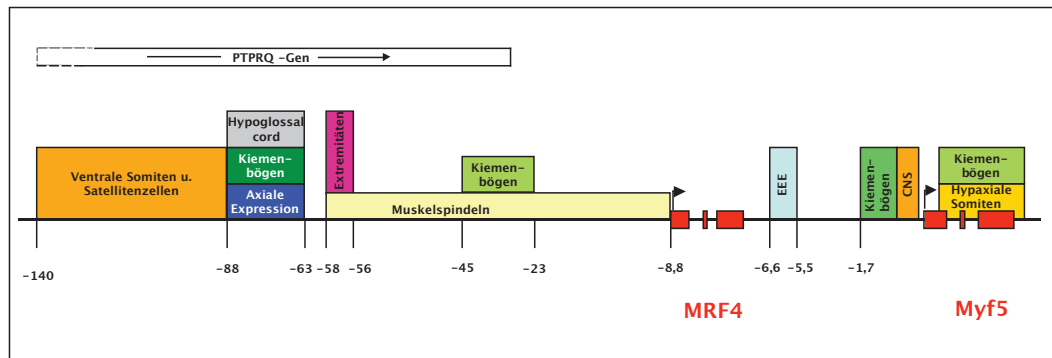


Abb. 1.2: Schematische Übersicht über den Genlokus des myogenen Transkriptionsfaktors *Myf5* und dessen regulative Elemente. Die regulativen Bereiche sind durch farbliche Boxen dargestellt. Die Abstände der Elemente sind im Bezug zu dem Transkriptionsstart von *Myf5* angegeben.

Über die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung von *Myf5* durch die multiplen Enhancer führen, ist bislang nur wenig bekannt. Für zwei Kontrollregionen, den frühen epaxialen Enhancer (Early Epaxial Enhancer, EEE) und den -58/-56 kb Enhancer (-58/-56 kb Limb Enhancer), konnten jedoch Signalwege und Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen beschrieben werden, die für ihre Aktivität notwendig sind (Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2003; Bajard et al., 2006; Buchberger et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beide Enhancer selektiv den *Myf5*-Promotor aktivieren und keine Interaktion mit den beiden weiteren Promotoren des Genlokus erfolgt. Die Forschungsergebnisse basieren in der Hauptsache auf genetischen Ansätzen und Analysen in transgenen Mäusen.

1.3 Der Early Epaxial Enhancer ist für die initiale *Myf5*-Expression in den Somiten verantwortlich

Der EEE ist für *Myf5*-Expression im dorsalen epaxialen Bereich junger Somiten verantwortlich und liegt ca. 6,5 kb stromaufwärts von *Myf5*, nahe dem 3' Ende von *MRF4* (Summerbell et al., 2000). Der Enhancer vermittelt den Beginn der *Myf5*-Expression in neu gebildeten epithelialen Somiten am Embryonaltag 8,5 *p.c.*. Deletionen der 500 bp langen EEE-Sequenz in Reporter-genkonstrukten zeigten, dass die Steuerung der *Myf5*-Expression jedoch bereits ab Embryonaltag

9,5 *p.c.* von weiteren Elementen übernommen wird (Teboul et al., 2003). Die Aktivierung durch den EEE wird durch den Sonic Hedgehog (Shh) Signalweg über eine Gli-Bindungsstelle innerhalb des Enhancers vermittelt (Borycki et al., 1999, Gustafsson et al., 2002). Ob dieser Signalweg den Enhancer ausschließlich oder nur die Aufrechterhaltung seiner Aktivität kontrolliert, wird kontrovers diskutiert (Kruger et al., 2001; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2003). Neuere Untersuchungen zeigen, dass neben dem Shh- auch der kanonische Wnt-Signalweg in die Aktivierung des EEEs eingreift. Mehrere TCF/Lef Bindungsstellen kooperieren mit der Gli-Bindungsstelle und vermitteln so seine vollständige Aktivität (Borello et al., 2006).

1.4 Der distale -58/-56 kb Enhancer kontrolliert *Myf5*-Expression in Somiten und Extremitäten

Der distal lokalisierte -58/-56 kb Limb-Enhancer steuert die *Myf5* Expression in den myogenen Vorläuferzellen der Extremitäten, der Somiten und des hypoglossalen Strangs (Hadchouel et al., 2000; Carvajal et al., 2001; Buchberger et al., 2003; Hadchouel et al., 2003). Durch funktionelle Deletionen von Reportergenkonstrukten wurden in transgenen Mäusen distinkte DNA Bereiche eingegrenzt, durch die die Expression in den Gliedmaßen und das korrekte räumliche und zeitliche Muster in den Somiten vermittelt werden (Buchberger et al., 2003; Hadchouel et al., 2003). Zwei unabhängig voneinander durchgeführte Studien zeigten, dass dabei ein einzelnes Homeo-paired-Domänen Bindungsmotiv im distalen Enhancer, sehr wahrscheinlich über Bindung des Transkriptionsfaktors *Pax3*, die Aktivierung von *Myf5* in den Extremitäten vollzieht (Hadchouel et al., 2006; Buchberger et al., 2007). Das Homeobox Protein *Pax3* sitzt in der genetischen Kaskade stromaufwärts der MRFs und ist zusammen mit *Pax7* essentiell für die Aktivierung von *Myf5* in den Somiten (Bober et al., 1994; Ben-Yair und Kalchheim, 2005; Gros et al., 2005; Kassam-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005; Buckingham and Relaix, 2007).

Die vom distalen -58/-56 kb Enhancer initiierte transgene Expression beginnt am Embryonaltag E9,5 im dorsalen (epaxialen) Myotom und weitet sich in ventraler Richtung auf die hypaxiale Domäne älterer Somiten aus (Buchberger et al., 2003). Im Vergleich zum endogenen *Myf5*-Expressionsmuster zeigt sich eine leichte Verzögerung der transkriptionellen Aktivierung in den Somiten, da

die frühe epaxiale Aktivierung des *Myf5* nicht gegeben ist. Färbung transgener Embryonen zeigt sich erst im sechsten bis siebten gebildeten Somiten (Buchberger et al., 2003). In den sich entwickelnden Extremitätenknospen zeigen eingewanderte Myoblasten Aktivierung der *Myf5*-Transkription in allen zukünftigen ventralen und dorsalen Muskelmassen.

Viele der *Myf5*-Enhancer befinden sich stromaufwärts des *Mrf4*-Gens in intronischen Sequenzbereichen des *Protein-Tyrosin-Phosphatase RQ* Gens (*PTPRQ*), das in Skelettmuskelzellen nicht aktiv ist (Wright et al., 1998), und in der intergenischen Region der beiden Gene. Insbesondere der frühe epaxiale Enhancer und der distale Limb Enhancer sind damit dem *Mrf4*-Promotor viel näher als ihrem Zielpromotor. Expressionsstudien und Reporteranalysen in transgenen Mäusen konnten zeigen, dass *Mrf4* durch diese Enhancer nicht angesprochen wird, weshalb es in den Zielgeweben zu diesen Zeitpunkten nicht aktiviert ist (Bober et al., 1991; Carvajal et al., 2002; Summerbell et al., 2002; Fomin et al., 2004). Die *Mrf4* Expression ist am Embryonaltag E9,0 auf das Myotom rostraler Somiten beschränkt. Nur zwischen E10,0 und E11,0 ist es im Myotom aller Somiten nachweisbar, wird aber dann wieder abgeschaltet. In den Extremitäten und den Kiemenbögen findet man *Mrf4* während der Embryonalphase nicht (Fomin et al., 2004).

Dies wirft die interessante Frage auf, durch welche Mechanismen die Spezifität der exklusiven Interaktion beider Enhancer mit dem *Myf5*-Promoter vermittelt wird. Für alle distal lokalisierten Kontrollelemente, wie z.B. die -58/-56 Region, muss zudem gefordert werden, dass sie durch Ausbildung einer Schleife in die Nähe des *Myf5*-Promotors gebracht werden. Ein direkter *in vivo* Nachweis für Interaktion distaler Enhancer mit dem Promotor, wie er mit der Chromatin Conformation Capture Technologie möglich ist, wurde für den *Mrf4/Myf5* Genloкус bislang nicht erbracht.

1.5 Die Spezifität von Promotor-Enhancer Interaktionen kann durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden

Die transkriptionelle Regulation funktionell verwandter Gene, die sich in enger Nachbarschaft auf einem Locus befinden, wurde in zahlreichen

Organismen intensiv untersucht. In *Drosophila* basiert selektive Promotor-Enhancer Interaktion innerhalb homeotischer Gen-Cluster einerseits auf der präzisen Struktur von basalen Promotor-Elementen, andererseits auch auf promotornahen Sequenzen, so genannten Tethering Elementen (Calhoun et al., 2002; Calhoun und Levine, 2003). Ebenfalls bei *Drosophila*, aber auch im β -Globin Lokus von Vertebraten verhindern proximal lokalisierte Insulator Sequenzen die Interaktion von Enhancern mit nicht konformen Promotoren (Übersicht in de Laat und Grosveld, 2003). Diese Mechanismen könnten auch bei der transkriptionellen Aktivierung von *Myf5* eine Rolle spielen und sollen im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Die Initiation der Transkription proteincodierender Gene (PolIII-Gene) wird durch Bindung der RNA Polymerase II an den Promotor ermöglicht, der als essentieller Bestandteil des Gens die Transkriptionsstartstelle zwischen Position -50 und +50 relativ zum Transkriptionsstart flankiert (Übersicht in Smale und Kadonaga, 2003). Der Promotor vermittelt die Rekrutierung genereller Transkriptionsfaktoren (GTFs), die zusammen mit der RNA-Polymerase den Präinitiationskomplex bilden, wodurch die Polymerase präzise am Startpunkt der Transkription positioniert wird (Gershon et al., 2008). Die wichtigsten Bestandteile dieses Komplexes sind neben der RNA-Polymerase II das TATA-Box bindende Protein (TBP) und die TBP assoziierten Faktoren (TAFs) (Smale und Kadonaga, 2003). Die Region in unmittelbarer Nachbarschaft zum Transkriptionsstartpunkt wird Basalpromotor genannt. Die Aktivität des Basalpromotors wird durch DNA Sequenzmotive gewährleistet, welche die Rekrutierung der generellen Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIB ermöglichen. Eines dieser Sequenzmotive ist die sog. TATA-Box, eine A/T-reiche Sequenz 25–30 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts, mit der Konsensussequenz TATAWAAR (Goldberg, 1979). Die TATA-Box positioniert den Präinitiationskomplex am Startpunkt, bestimmt dessen Lage und vermittelt die Wirkung weiterer Transkriptionsfaktoren auf den Initiationskomplex. In vielen Fällen liegt in direkter Nachbarschaft zu der TATA-Box ein weiteres Basalelement, das BRE (TFIIB recognition element; Lagrange et al., 1998; Deng et al., 2005). Dieses Element kann sowohl stromaufwärts (BRE^u) als auch stromabwärts (BRE^d) zu der TATA-Box positioniert sein und zeigt in Abhängigkeit des Promotor-Kontextes einen positiven oder negativen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität (Lagrange et al., 1998; Deng und Roberts, 2007). Neben diesen beiden Elementen konnten eine Reihe weiterer Basalelemente, wie

der Initiator (Inr; Smale und Baltimore, 1989), der oft in Kombination mit einem DPE (downstream promoter element; Burke und Kadonaga, 1996) die Positionierung des Präinitiationskomplexes in TATA-losten Promotoren vermittelt, sowie das MTE (motif ten element; Lim et al., 2004), DCE (downstream core element; Lewis et al., 2000) und das XCPE1 (X core promoter element 1; Lim et al., 2004) beschrieben werden. Aufgrund der fortschreitenden Annotation und Charakterisierung neuer Gene durch den Einsatz moderner und effizienter Techniken, ist davon auszugehen, dass in der Zukunft noch weitere Kernpromotor-Motive identifiziert werden (Butler und Kadonaga, 2002; Gershon et al., 2008). Die TATA-Box, Inr, MTE, DPE und DCE sind Erkennungssequenzen für die Bindung des Transkriptionsfaktors IID, während BRE^u und BRE^d mit TFIIB interagiert (Deng und Roberts, 2005, 2007). Die inhärenten Eigenschaften eines jeden Promotors, die durch die Anwesenheit verschiedener Basalpromotor-Elemente gegeben sind, vermitteln selektive Interaktion bestimmter Enhancer-Promotor Kombinationen, indem sie die Effizienz der Interaktion verstärken bzw. verringern (Butler und Kadonaga, 2002; Juven-Gershon und Kadonaga, 2009). Dieser als Promotor Kompetition bezeichnete Mechanismus beschreibt die selektive Genaktivierung durch Bevorzugung eines dominanten Promotors in kompetitiver Situation (Choi und Engel, 1988; Conte et al., 2002; siehe Abb. 1.3 A). Viele Promotoren von PolII-Genen enthalten in ihrer proximalen Umgebung weitere Elemente wie GC- oder CAAT-Boxen, welche die Transkriptionsrate des Promotors steigern können (Dyran und Tjian, 1985).

Zu der Kategorie der proximalen Promotorelemente gehören ebenfalls die sog. „Promotor Tethering Elemente“ (PTE), die über Protein-Interaktionen mit einem distalen Enhancer interagieren (Sipos et al., 1998; Akbari et al., 2007). Während der selektiven Rekrutierung des Enhancers kommt es zur Ausbildung einer Schlaufenstruktur, wodurch der distale Enhancer in die räumliche Nähe des Promotors gelangt und somit die Aktivierung des responsiven Gens ermöglicht (Abb. 1.3 B). Im transgenen Kontext konnte gezeigt werden, dass PTEs unabhängig vom endogenen Promotor auch in der Lage sind, die Expression von heterologen Promotoren zu regulieren (Akbari et al., 2008).

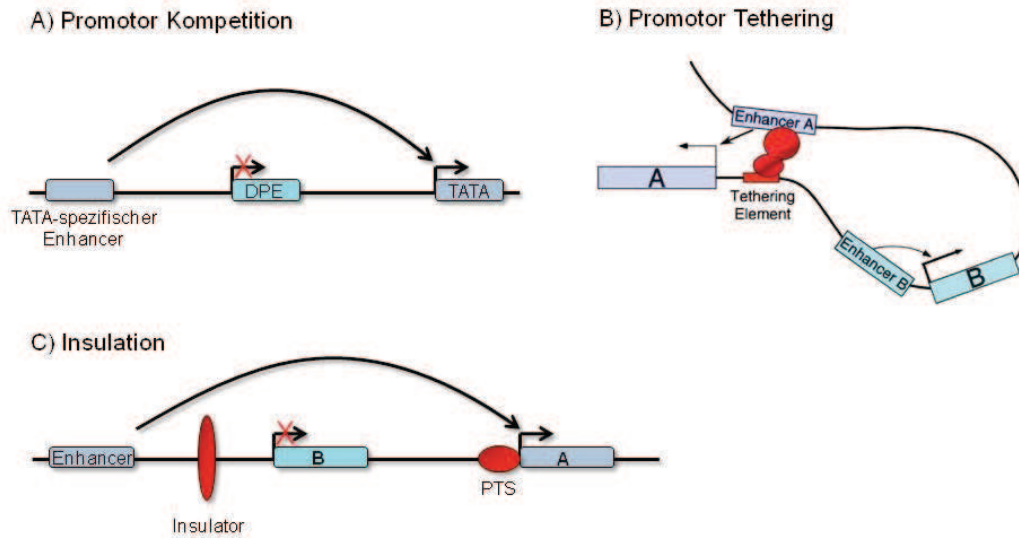


Abb. 1.3: Mechanismen der selektiven Promotoraktivierung. A) Promotor Konkurrenz beschreibt die Bevorzugung eines Promotors über seine intrinsischen Eigenschaften; DPE: DPE-haltiger Promotor, TATA: TATA-Box-haltiger Promotor B) Promotor Tethering Elemente vermitteln die Rekrutierung eines distalen Enhancers über Protein-vermittelte Schlaufenbildung. (Abbildung aus Calhoun et al., 2002) B) Insulatoren bewirken eine Abschirmung und verhindern eine Interaktion zwischen Enhancer und Promotor; PTS: Promotor Targeting Sequenz

Insulatoren sind DNA-Sequenzen, welche die Fähigkeit besitzen, Gene vor störenden Signalen aus der Umgebung zu schützen. Zur Definition von Insulator-Elementen existieren zwei klassische Kriterien. Ursprünglich wurden sie durch ihre Fähigkeit entdeckt, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen (Udvardy et al., 1985; Sun und Elgin, 1999). Die zweite Eigenschaft von Insulatoren ist die sog. „Enhancer Blocking“ Aktivität, für die der Insulator zwischen Enhancer und Gen lokalisiert sein muss (Bushey et al., 2008; siehe Abb. 1.3 C). Die Blockade führt zu keiner Inaktivierung der einzelnen Elemente, da beide weiterhin mit anderen regulatorischen Sequenzen kommunizieren können. Insulatoren wurden erstmals in *Drosophila* identifiziert (Udvardy et al., 1985), jedoch wurden sie auch für verschiedene Vertebraten, darunter Maus und Mensch, beschrieben (Felsenfeld et al., 1996; Bell und Felsenfeld, 1999). Für viele Insulatoren konnten DNase I hypersensitive Bereiche beschrieben werden, welches ein Indiz für Proteinbindung sind. Mit dem Transkriptionsfaktor „CCCTC-Binding Factor“ (CTCF) wurde ein Insulator-

bindendes Protein identifiziert, das für die funktionelle Abschirmung von Genen in Vertebraten essentiell ist (Bell et al., 1999). Bisher ist CTCF das einzige Protein in Säugetieren, das durch die Bindung an einen Insulator die Blockade von Enhancern bewirken kann. Die molekulare Wirkungsweise von Insulatoren ist noch weitgehend unverstanden. Die wahrscheinlichste Modellvorstellung beschreibt die Ausbildung von DNA-Schleifen durch Interaktion des Insulators mit weiteren regulatorischen Elementen, wie z.B. die Promoter Targeting Sequenz (Lin et al., 2007), oder mit Komponenten des Zellkerns, wie Zellmatrix und Kernpore (Labrador und Corces, 2002; Dunn et al., 2003; Nikolaev et al., 2009). Durch die Ausbildung solcher DNA-Schleifen wird der Enhancer zum responsiven Promotor rekrutiert und räumlich von nicht-responsiven Promotoren getrennt.

1.6 Zielsetzung

Die differentielle Expression der Gene *Mrf4* und *Myf5* wird durch zahlreiche modulare Enhancerregionen, die über einen Bereich von 140 kb innerhalb des gemeinsamen genetischen Locus verstreut sind, reguliert. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Aufklärung der Mechanismen, die der selektiven Interaktion einzelner Enhancer mit den beiden MRF-Promotoren zu Grunde liegen. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf den distalen -58/-56 kb Enhancer, der *Myf5* u. a. in den Muskelvorläuferzellen der Extremitäten aktiviert, und den EEE, der für die frühe Expression von *Myf5* im epaxialen Myotom verantwortlich ist. Obwohl die Enhancer näher am *Mrf4*-Gen lokalisiert sind, führen sie *in vivo* nicht zu dessen Aktivierung, sondern treiben ausschließlich die Expression von *Myf5*.

Beide Enhancer wurden durch Einzel- und/oder Doppelreporterkonstrukte in transgenen Mäusen untersucht, wodurch es möglich war, die individuelle Aktivierung des *Myf5*- oder *Mrf4*-Promotors, aber auch simultan die Aktivierung beider Promotoren, zu verfolgen. Ausgehend von Konstrukten, welche die *in vivo* Regulation der Enhancer widerspiegeln, sollten durch sukzessive Deletionen genomische Abschnitte ermittelt werden, durch die ein Verlust der selektiven Promotoraktivierung erfolgt. Diese potentiell regulatorischen Bereiche wurden nachfolgend weiteren funktionellen Analysen unterzogen.

Die Frage, ob intrinsische Eigenschaften des *Mrf4*- oder *Myf5*-Promotors Grundlage der selektiven Interaktion sein könnten, wurde einerseits durch den Austausch mit heterologen Promotoren und andererseits durch das Ersetzen von *Mrf4*-Promotor Sequenzen durch analoge *Myf5*-Bereiche, untersucht.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Problematik, wie die Promotoraktivierung von *Myf5* durch weit entfernte regulatorische Elemente realisiert wird. Am Beispiel des distalen -58/-56 kb Enhancers sollte durch die Methode des Chromosome Conformation Capture (3C) die Interaktion weit entfernter Elemente durch die Bildung einer Schlaufenstruktur untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden Biochemikalien und handelsübliche Chemikalien in Analysequalität der Firma Sigma (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Seelze), Becton Dickinson (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) verwendet. Flüssigchemikalien wurden von den Firmen J.T. Baker (Deventer, Holland) und Fisher Scientific (Loughborough, U.K.) bezogen. Verbrauchsmaterialien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Wilke & Witzel (Hamburg) geliefert.

2.2 verwendete Kits

Nucleobond® Xtra Maxi	Machery & Nagel
NucleoSpin® Extract II	Machery & Nagel
peqGOLD RNAPure™	peqLab
ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	GE Healthcare
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
Qiaquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech

2.3 Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrock et al. (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert, bzw. sterilfiltriert.

2.4 Radiochemikalien

Radioaktiv markiertes [$\gamma^{32}\text{P}$]-Adenosin 5'-Triphosphat (ATP) wurde von den Firmen Hartmann Analytik GmbH (Braunschweig) und Perkin Elmer (Rodgau – Jügesheim) bezogen. Es wurde radioaktives Material mit einer Radioaktivitätskonzentration von 370 MBq (10mCi/ml) und einer spezifischen Aktivität von 111TBq (3000Ci/mmol) verwendet.

Lösung: 10 mM TRIS-HCl, 2 mM DTT

2.5 Antibiotika

Die Stammlösungen der entsprechenden Antibiotika wurden steril filtriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die entsprechende Menge an Lösung wurde den autoklavierten Wachstumsmedien erst nach Abkühlen auf ca. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hinzu gesetzt.

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in H_2O
Kanamyzin-Stammlösung:	30 mg/ml in H_2O
Tetracyclin-Stammlösung:	12,5 mg/ml in 50% Ethanol

2.6 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment	Promega
GoTaq [®] DNA Polymerase	Promega
Phusion High Fidelity Polymerase	Finnzymes
PrimeScript [™] Reverse Transcriptase	Takara Bio Inc.
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNAse A	Qiagen

RNasin® Plus RNase-Inhibitor	Promega
RQ1 RNase-free DNase	Promega
rTaq-Polymerase	Takara Bio Inc.
T4 Ligase	New England Biolabs
T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs

2.7 Bakterienstämme

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurde folgender *E. coli*-Stamm der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet:

XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac,
 [F' proAB, lacI^qΔM15, Tn10(tet^R)]

2.8 Mausstämme

Für die Generierung transgener Tiere mittels Pronukleusinjektion wurden Tiere des Stammes H19ICR (CD1) verwendet. Sterile Männchen für die Gewinnung scheinträchtiger Weibchen wurden durch Vasektomierung nach den Angaben von Hogan et al. (1994) generiert. Die verwendeten Mäuse stammten aus eigener Zucht. Alle Mäuse wurden in klimatisierten Räumen mit einem 12:12 Licht-Dunkelwechsel gehalten.

2.9 Eukaryontische Zelllinien

C3H/10T1/2: Maus Fibroblasten Zelllinie (Reznikoff et al., 1973)

2.10 Vektoren

COS F0139Q	Cosmid Klon mit Lawrist-7 Vektor-Rückgrat (RZPD, Berlin)
pCR®-Blunt	Invitrogen

pGEM®-T Easy	Promega
pRL-TK	Promega
phs3LacZA	Dr. J. Rossant; Mount Sinai Research Inst.
RP23-113D5	RPCI-23 Female (C57BL/6J) Mouse BAC Library; CHORI
pcDNA3	Invitrogen
pORF14-PLAP	Invivogen

2.11 Oligonukleotide

Als Bezugsquelle für Oligonukleotide diente die Firma Eurofins MWG (Ebersberg). Das Design und die Kontrolle der Primer erfolgte mit Unterstützung der im Internet verfügbaren Programme „Primer 3“ und dem Oligo Analyse-Programm der Firma Eurofins MWG.

2.11.1 Genotypisierungsprimer

AP 5´:	GAG CCT GGA GAC ATG AAA TAC G
AP 3´:	CAC TGC TGA CTG CTG CCG ATA C
LacZ 5´:	TTG CCG TCT GAA TTT GAC CTG
LacZ 3´:	TCT GCT TCA ATC AGC GTG CC

2.11.2 Sequenzierungsprimer

2kb Enhancer 5´:	GCT TCT CTT CCC AGT TAG AAA G
2kb Enhancer 3´:	GCT TGA TCC CAC ATG GAA AT
AP Seq 5´:	TCT CCT CCT CAA CTG GGA TGA T
AP Seq 3´:	CCT CTA CAA ATG TGG TAG ATC CA

HSP 5': CAG GAA TCT TCC AGC AGT TTC G
 Myf5 Prom Seq: CGT GTC TCC CTC TCT GCT GAA
 Mrf4 Sall 5': GTC GAC TTA TGT CAC CGC ACT
 SP6: TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA
 T7: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG

2.11.3 Primer für das Chromosome Conformation Capture

3C-1 rev: GTT CCG TAT TTC CGT CTA ACA CCA AAG G
 3C-1 rev nested: GAA CCT AGC TTC TGG ATT CTT AAC GCA C
 3C-10 rev: ATA CAC ACA GAT AGT CAC AGT GCC GAA A
 3C-1: CAA GCT CTC TAG GTT CAT GCC ATC CAT G
 3C-4: CAG GGA CTC TTA ACA ACT CTT AGG AGG
 3C-4 nested: AGG ACT TTG GGA TTG AAC TTA GAT CTC C
 3C-10: CAG AAC AGA GTA AGG AGC CGA ACC TCA C
 3C-14: GAG AAT GAG TGC TTC TCG GAC ATA AGT C
 3C-14 nested: GCT TAG CCT GGT TCT GAG AAC TCT GAT G
 3C-24: GGT CAG AAG GTG ACC ATG AGG AAA TGA AG
 3C-24 nested: CCA ATA GCA GGG CAG AAG AGA CAT TGG T
 3C-34: GTT CTC CTG GAG GTT AGC TGG CAT AAA C
 3C-34 nested: CTG TTG CTG CCT TGA TTA ATG GTT GAC G
 3C-40: TCC CAC TAG TGC TGT GTA TAG GTC ATC
 3C-40 nested: GAG TTC TAT GAC ATA TCT TCA ACC ATG TGC TGT
 3C-52: ATG ACT TCA GCA GCA AGA GGA GAA ACC
 3C-52 nested: GCA GTG TCC AGG AAG CAG AAT AGA AAG A
 3C-56: GGT GAA GAG CGC TTG GTA CAA ACA TCA G

3C-56 nested:	CTC TCT GCA CCT CAG TGT CTT CAT TTG T
3C-58:	CAT CAT GCC TTG ATT GTT CTT CCG TCT G
3C-58 nested:	CTC TGC TCA GTG TTT GTA GCT TGG TGT C
3C-65:	CTG TCC TGA CCA GTA GAT AAC CAA CCA C
3C-65 nested:	GTG TCA ATC TGT AAG GAC CAA GAC AAT GG
3C-75:	CGG TAA CAG AAT CAC CAG AAG AAC AAT C
3C-75 nested:	CGG AGG AAT CTT ACT AAC AGG AAC CAA G
3C-142:	GTG TAG GTC TCT GTA CCC ATG CCA GTA G
3C-142 nested:	ACT GTC TGA GGG CCT TTA GAG AAG AAT G
GAPDH forward:	CAT CTG TTG CTC CGG CTC TCA TTT TTG C
GAPDH reverse:	CAG TCT GGG TAC AAG CTT GGC ACA TCA

2.11.4 5' RACE Primer

Mrf4 5' N-RACE:	GCT CCT GCA TCT TCT CTT GCT GAT C
Mrf4 RACE 2:	GGT GCA GCA GGT CCT GTA GAC GCT CAA TG
Mrf4 Seq 5':	CAC TCC GCA GAA TCT CCA CCT

2.11.5 sonstige Oligonukleotide

5' Linker mit Restriktionsschnittstellen für transgene Konstrukte

Linker sense:	CGC GGC CGC CCG CGG CTC GAG GCA TG
Linker antisense:	CCT CGA GCC GCG GGC GGC CGC GCA TG

AP-Primer mit KpnI-Schnittstellen für Mrf4-AP Klonierung

5' PLAP:	CTG AGA TCA CCG GTA CCC TGA GGA GGC ACA TC
3' PLAP:	CAA CGC GGC CTT TTT ACG GTA CCT GGA CCT TTT GC

2.12 Hergestellte Konstrukte

Alle hergestellten Konstrukte für die transgene Analyse basierten auf dem pGEM®-T Easy Vektor System der Firma Promega. In diesem Vektorsystem flankieren zwei NotI-Schnittstellen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme SacII, EcoRV und SpeI. Diese drei Schnittstellen wurden für die Klonierungen der entsprechenden DNA-Kassetten verwendet. Die NotI-Schnittstellen wurden zur Beseitigung des Vektorrückgrats während der DNA-Aufreinigung zur Vorbereitung der DNA für die Pronukleusinjektion benötigt. Für die komplexeren Doppelreporterkonstrukte wurde der pGEM®-T Easy Vektor mit einer zusätzlichen XhoI-Schnittstelle erweitert. In diesem erweiterten Vektor standen die folgenden Restriktionsschnittstellen zur Verfügung: NotI-XhoI-SacII-EcoRV-SpeI-NotI.

Mrf4-6: Die Sequenz des -58/-56 kb Enhancers wurde inklusive umgebene Multiple Cloning Site aus Konstrukt 2.2LacZE1 (Lindert, 2004) über einen ApaI/SacII-Verdau isoliert und in die ApaI/SacII-Schnittstellen des pGEM®-T Easy Vektors kloniert. Das *Mrf4*-LacZ Fragment wurde durch einen PmeI/NotI-Verdau aus MRF4-XV (Fomin, 2005) gewonnen und über die SpeI-Schnittstelle in den Vektor eingebracht.

AP1: Für das Konstrukt AP1 wurde das humane alkalische Phosphatase Reportergen (AP) in das Leseraster des *Mrf4*-Gens inseriert. Die Klonierung erfolgte über die KpnI-Schnittstelle, welche 120 Nukleotide hinter dem ATG in Exon 1 liegt. Hierzu wurde zunächst die AP-Sequenz aus dem kommerziell erhältlichen Vektor pORF-PLAP (Invivogen) amplifiziert und in den Vektor pcDNA3 subkloniert. Die Orientierung konnte durch das Enzym BamHI kontrolliert werden. Das pORF-PLAP Plasmid besitzt eine 1608 bp lange cDNA Sequenz der humanen plazentalen Alkalischen Phosphatase. Die verwendeten Primer besaßen durch eine modifizierte Sequenz eine KpnI-Schnittstelle und ermöglichten somit die KpnI-Flankierung des Amplifikats. Das 1977 bp lange PCR-Produkt enthielt ein SV40-Polyadenylierungssignal. Der pcDNA3-Vektor besitzt einen konstitutiven CMV-Promotor und konnte zur Überprüfung der Funktionalität der amplifizierten AP durch Transfektion in eukaryotische 10T1/2-Zellen verwendet werden. Die Alkalische Phosphatase wurde anschließend durch einen KpnI-Verdau aus dem Vektor isoliert und in den KpnI-geschnittenen

Vektor GFP2.1 (Lindert, 2005) kloniert. Das Plasmid GFP2.1 enthält einen *Mrf4*-GFP Reporter einschließlich 11,4 kb des 5´-flankierenden Bereiches und 3,9 kb des 3´-flankierenden Bereiches. Durch KpnI-Verdau wurde der GFP-Reporter aus dem Konstrukt entfernt und anschließend durch den AP-Reporter ersetzt. Die richtige Orientierung wurde über einen PmeI/SacII-Verdau bestätigt und der Erhalt des offenen Leserasters durch eine Sequenzierung überprüft.

APZ-1: Das transgene Konstrukt APZ-1 wurde durch Modifikation des Plasmids GFP4 (U. Lindert, 2005) hergestellt. Dabei wurde durch Restriktionsverdau von GFP4 mit den Enzymen PmeI und SpeI ein 6,9 kb *Mrf4*-Fragment einschließlich GFP-Reporter entfernt und durch das PmeI/SpeI-Fragment aus AP1, welches die *Mrf4*-AP Reportergen-Kassette enthält, ersetzt.

APZ-2: Für höhere Variabilität in nachfolgenden Klonierungen wurde zunächst an dem 5´-Ende des GFP4-Plasmids eine Oligonukleotidsequenz eingebracht, welches die Konsensussequenzen für die Restriktionsenzyme NotI, SacII und XhoI enthält. Die Orientierung des Oligonukleotids wurde durch eine Sequenzierung mit T7-Primer überprüft. Im folgenden Schritt wurde der -58/-56 kb *Myf5*-Enhancer in die SacII-Schnittstelle kloniert und der *Mrf4*-GFP-Reporter wurde durch einen PmeI/SpeI-Verdau mit dem *Mrf4*-AP-Reporter aus AP1 getauscht.

APZ-4: NotI/BglII-Restriktionsspaltung des Konstruktes APZ-2 isolierte die inserierte DNA vom Vektorrückgrat. Die BglII-Schnittstelle befindet sich 220 Nukleotide hinter der *Mrf4*/AP-Integrationsstelle und es konnten somit Sequenzen stromabwärts des *Mrf4*-AP Reporters entfernt werden. Nach der Gelextraktion wurden beide Enden des Fragments mit einer Klenow-Polymerase geglättet und nach dem Zufügen eines einzelnen Adenosin-Nukleotids durch eine Taq-Polymerase Reaktion, wurde das Fragment in die T-Überhänge des Vektors pGEM®-T Easy kloniert. Die korrekte Orientierung wurde durch die Restriktionsenzyme AatI/PmeI bestätigt. Das Fragment des *Myf5*-Minimalpromotors wurde durch Spaltung des Plasmids APZ-2 mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI isoliert. NotI trennt das Gesamtkonstrukt von dem Vektorhintergrund, während sich die XbaI-Schnittstelle 296 Nukleotide

stromaufwärts des *Myf5*-ATGs befindet. Die geglätteten Enden des Fragments wurden mit *SpeI*-Linkermolekülen ergänzt und anschließend in den mit *SpeI* geöffneten und dephosphorylierten *Mrf4/pGEM*[®]-T Easy Vektor kloniert. Die Kontrolle der Orientierung wurde durch Sequenzierung mit SP6-Primer durchgeführt.

APZ-5: Der für dieses Konstrukt verwendete Promotor des murinen *Heat Shock Inducible* Gens (*hsp70*) wurde aus dem Plasmid phs 3 LacZ A (Dr. J. Rossant; Mt. Sinai Research Institute) über *PstI*-Restriktionsspaltung isoliert. Nach erfolgter Glättung der Enden, wurde der Restriktionsverdau über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und das 4,5 kb große *Heatshock-LacZ* Fragment aus dem Gel extrahiert. Das erhaltene Fragment wurde in die geglättete *SpeI*-Schnittstelle des *Mrf4/pGEM*[®]-T Easy Plasmids aus der APZ-4 Klonierung ligiert. Die Kontrolle der Orientierung wurde mit einem *Clal*/*PmeI* Doppelverdau durchgeführt.

APZ-7: Die Religation des linearen Vektors *pGEM*[®]-T Easy ergibt ein circuläres Plasmid mit einer neu entstandenen *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle, welche für folgende Klonierungen verwendet wurde. Der religierte Vektor wurde mit *SacII* linearisiert und nach der Extraktion aus einem Agarosegel dephosphoryliert. Der linearisierte Vektor wurde mit einem -58/-56 kb Enhancer-Fragment ligiert und mit *BstXI* auf entsprechende Orientierung überprüft.

Der Promotor des *Herpes Simplex Virus* Thymidin Kinase Gens (HSV-TK) wurde aus dem Reporter-Plasmid *pRL-TK* (Promega) isoliert. Das Plasmid *pRL-TK* wurde mit *HindIII* gespalten und nach Glättung der überstehenden Enden aus einem Agarosegel extrahiert und dephosphoryliert. Der linearisierte Vektor wurde anschließend mit der amplifizierten Alkalischen Phosphatase ligiert. Die Restriktionsenzyme *BglII* und *DrdI* flankieren das 2750 bp TK-AP Fragment und wurden zur Isolierung verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde als geglättetes Fragment in die *EcoRV*-Schnittstelle des -58/-56 kb *Myf5*-Enhancer-haltigen *pGEM*[®]-T Easy Vektors kloniert. Die Bestätigung der Orientierung erfolgte durch einen Doppelverdau mit den Enzymen *BamHI* und *XhoI*.

Das *HS-LacZ* Fragment stammte aus dem Plasmid phs 3 LacZA und wurde während der APZ-5 Klonierung isoliert. Die Klonierung erfolgte als geglättetes

Fragment in die aufgefüllte *SpeI*-Schnittstelle des APZ-7 Plasmids und wurde durch einen *SacII*-Verdau kontrolliert und mit einer nachfolgenden Sequenzierung mit einem 5´gerichteten *LacZ*-Primer bestätigt.

APZ-8: Das Plasmid APZ-4 wurde durch einen enzymatischen Verdau mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *PmeI* gespalten und nach anschließender Glättung der überstehenden Enden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach durchgeführter Gelextraktion des 13 kb Fragments erfolgte die Religation des Vektors.

APZ-9: Durch eine enzymatische Spaltung des Konstrukts APZ-4 mit den Enzymen *Asel* und *NotI* konnte ein 6,4 kb großes DNA-Fragment isoliert werden, welches die beiden Minimalpromotoren von *Mrf4* und *Myf5* mitsamt den Reportergenen enthält. Dieses Fragment wurde in die *EcoRV*-Schnittstelle des -58/-56 kb Enhancer-haltigen pGEM®-T Easy Vektors aus der APZ-7 Klonierung ligiert. Die Kontrolle der Orientierung erfolgte durch Restriktionsspaltung mit *SacII* und die Vollständigkeit des Plasmids wurde durch zusätzliche Restriktion mit den Enzymen *KpnI* und *SpeI* bestätigt.

APZ-12: Die Isolierung des *TK*-AP Fragments erfolgte durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *BglII* und *DrdI* des pRL-*TK*-AP Vektors (siehe APZ-7). Die Enden des Fragments wurden durch Klenow-Enzym geglättet. Das aufgereinigte Fragment wurde in einen mit *EcoRV*-linearisierten pGEM®-T Easy Vektor ligiert. Das *HS*-*LacZ* Fragment stammt aus dem Plasmid phs 3 *LacZA* und wurde während der APZ-5 Klonierung isoliert. Die Klonierung erfolgte als geglättetes Fragment in die aufgefüllte *SpeI*-Schnittstelle des *TK*-AP tragenden pGEM®-T Easy Vektors.

Die DNA Fragmente des -58/-56 kb *Myf5*-Enhancers und des -7,4/-0,6 kb *Mrf4*-Bereiches konnten aus dem Plasmid APZ-2 durch einen *NotI*/*NdeI* Verdau isoliert und als blunt end Fragment in einen mit *EcoRV* linearisierten und dephosphorylierten pGEM®-T Easy Vektor kloniert werden. Nach der Bestätigung der Orientierung durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen *BamHI*/*NcoI* erfolgte Linearisierung des Plasmids durch *SpeI*, Glättung der Enden und

Dephosphorylierung. Für die nachfolgende Ligation wurde das TK/AP-HS/LacZ Doppelreporterfragment über einen NotI-Verdau isoliert und ebenfalls geglättet. Die Orientierung des ligierten DNA-Fragments wurde über Restriktionsanalysen mit den Enzymen SacII und EcoRV überprüft und durch eine Sequenzierung bestätigt.

EE-1: Der verwendete *Mrf4*/LacZ-Reporter wurde aus dem Plasmid „Construct 13-URA“ von M. Fomin durch einen PmeI/NotI-Doppelveidau isoliert. Das resultierende Fragment bestand aus einer 3kb *Mrf4*-Promotorsequenz und dem *LacZ*-Reporterogen. Nach Ligation mit SpeI-Schnittstellenoligonukleotiden erfolgte die Klonierung in SpeI-linearisierten pGEM-TEasy Vektor. In dieses Plasmid wurde daraufhin der Early Epaxial Enhancer als XhoI-Fragment ligiert. Das 542 bp Fragment des Enhancers wurde durch ein XmnI/BamHI-Doppelveidau des Konstrukts APZ-1 isoliert. Die Orientierungen des Reporter-Fragments sowie des Enhancers wurden durch Sequenzierungen überprüft.

EE-2: Für die Klonierungen des EE-2 Konstruktes wurde das *Mrf4*-LacZ Fragment aus dem EE-1 Konstrukt über einen SpeI-Verdau entfernt und durch ein im 5'-Bereich erweitertes *Mrf4*-LacZ Fragment ersetzt. Dieses Fragment stammt aus dem Plasmid construct13-URA (M.Fomin) und wurde durch einen SphI/NotI-Verdau gewonnen. Nach durchgeführter elektrophoretischer Auftrennung und Gelextraktion wurden die Enden des DNA-Fragments geglättet und mit SpeI-Linkermolekülen versehen, um anschließend in den TEasy-EEE Vektor ligiert werden zu können. Die korrekte Orientierung des inserierten Fragments konnte durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen SacII/PmeI bestätigt werden.

EE-3: Für das Konstrukt EE-3 wurde das *Mrf4*-LacZ Fragment aus EE-1 durch ein *Myf5*-LacZ Fragment ersetzt. Die *Myf5*-LacZ DNA stammte aus dem Konstrukt APZ-4 und wurde als SpeI-Fragment in den mit SpeI verdauten und dephosphorylierten Vektor EE-1 kloniert werden. Die Überprüfung der Orientierung erfolgte mit dem Restriktionsenzym NdeI.

EE-6: Das zu klonierende basal-*Mrf4/AP* Fragment konnte aus Plasmid APZ-4 über einen Verdau mit *Asel/Spel* isoliert werden. Nach erfolgter Glättung der Enden wurde dieses in das Konstrukt EE-2 kloniert, nachdem diesem der vorhandene *MRF4/LacZ* Reporter über einen *Spel*-Verdau entfernt wurde. Die Orientierung des ligierten Fragments konnte über einen *NdeI*-Verdau verifiziert werden.

EE-10: Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von *HindIII*-geschnittener DNA des Phagen Lambda konnte ein 2322 bp Fragment isoliert werden. Dieses wurde mit geglätteten Enden in einen mit *EcoRV* linearisierten und dephosphorylierten EE-6 Vektor ligiert. Die *EcoRV*-Schnittstelle befindet sich zwischen dem Early Epaxial Enhancer und dem *Mrf4*-Promotor.

EE-11: Über zwei aufeinander folgende Restriktionsverdaue konnte eine 2545 bp Sequenz aus dem proximalen Bereich des *Mrf4*-Promotors isoliert werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt das Konstrukt EE-2 mit den Restriktionsenzymen *PmeI* und *KpnI* geschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte ein ca. 3 kb großes Fragment extrahiert werden, das den *Mrf4*-Promotorbereich einschließlich Transkriptionsstart und Teile des Exons 1 enthält. Dieses Fragment musste durch einen partiellen Verdau mit dem Enzym *Asel* unvollständig geschnitten werden, da das Zielfragment eine weitere *Asel*-Schnittstelle aufwies. Nach erneuter gelelektrophoretischer Auftrennung konnte das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert werden. Für die nachfolgende Ligation wurde das Konstrukt EE-3 durch einen Restriktionsverdau mit *SacII* linearisiert und dephosphoryliert. Die richtige Orientierung des ligierten Fragmentes wurde durch die Enzyme *AccI* sowie *HindIII/NotI* bestätigt.

2.13 Geräte

Analysewaage LA820

Sartorius

Bakterienbrutschrank B6120

Heraeus Instruments

Binokular MZ6

Leica

Material

Binokular MZ FCIII	Leica
CO ₂ – Brutschrank BBD6220	Heraeus Instruments
Digitalkamera PDMC3	Polaroid
Digitalkamera ProgRes C12	Jenoptik
Geldokumentation CS1	Cybertech
Geldokumentation Video Processor P67E	Mitsubishi
Inkubationsschüttler G24 und G25	New Brunswick Scientific; Edison, USA
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge J2–MC	Beckmann
Mikroinjektion Transjector 5246	Eppendorf
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Mikroskop Leitz DM RBE	Leica
pH Meter CG840	Schott
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Power Supply Model 200/2.0	BioRad
Scintillationszähler LS 6000 SC	Beckmann
Sequenzierer ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
sterile Werkbank HLB 2448 GS	Heraeus
Thermocycler TGradient	Biometra
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultraturrax T25	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Universalwaage U6100	Sartorius
UV Tisch N90 NW 312nm	Konrad Benda
Vibratom VT 1000 E	Leica

2.14 Online Datenbanken und Computerprogramme

Basal Local Alignment Tool (BLAST)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop® CS Version 8.0.1
Bildbearbeitung	Helicon Focus Version 4.80.3.0
Ensembl Genome Browser	www.ensembl.org
MWG Oligo Property Scan	https://ecom.mwgdna.com/services
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu
Sequenzalignment	ClustalX 2.0.10
Sequenzanalyse	Vector NTI Suite 7

3 Methoden

Die im Folgenden aufgelisteten molekularbiologische Standard-Methoden wurden, sofern nicht anders aufgeführt, nach Standard-Protokollen oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt (Sambrock et al., 1989; Ausubel et al., 1992): Agarose-Gelelektrophorese, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Erzeugung von glatten DNA-Enden, Phosphorylierung, Ligation, Restriktionsspaltung von DNA, Phenol/Chloroformextraktion von DNA, Herstellung kompetenter *E. coli*, Transformation von *E. coli*. Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde nach der Methode der alkalischen Lyse aufgereinigt (Birnboim und Doly, 1979), die Aufreinigung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Nucleobond X-tra Maxi Kit“ (Machery & Nagel, Düren).

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte wurden den Sicherheitsbestimmungen entsprechend durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit bidestilliertem H₂O erstellt und anschließend autoklaviert oder sterilfiltriert, um die Lösungen keimfrei zu halten.

3.1 Arbeiten mit DNA

3.1.1 Lagerung

Die Lagerung von DNA erfolgte in TE-Puffer bei -20 °C.

TE-Puffer: 10mM Tris/HCl pH7,6; 1mM EDTA

3.1.2 Enzymatische Modifikationen von DNA

Modifikationen von DNA wurden mit Hilfe von Enzymen durchgeführt, die gemäß den Herstellerangaben verwendet wurden. Sämtliche Reagenzien und Proben für die enzymatische Reaktion wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt verarbeitet.

3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Für die Genotypisierung von transgenen Mäusen wurde genomische DNA aus der Spitze von Mausschwänzen bzw. aus den Fruchthüllen der entsprechenden Embryonen isoliert. Dazu wurde das Gewebe mit 500 µl Lysispuffer versetzt und ü. N. bei 55 °C geschüttelt. Anschließend wurde das lysierte Gewebe 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und durch Mischen von 100 µl des Überstandes mit 100 µl Isopropanol die DNA gefällt. Nach einem nachfolgenden Waschschrift mit 70% Ethanol wurde die getrocknete DNA in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Lysispuffer: 100 mM Tris (pH 8,5), 5 mM EDTA (pH 8), 0,2% SDS, 200 mM NaOH, 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) auf 500 µl

TE-Puffer: 10mM Tris/HCl pH7,6; 1mM EDTA

3.1.4 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Hybridisierung von zwei komplementären Oligonukleotiden wurden jeweils 1 µmol der entsprechenden DNA-Einzelstränge in einem Volumen von 20 µl für 5 Minuten bei 100 °C in entsprechenden Puffer gekocht um dann anschließend für 10 Minuten in ein 75 °C warmes Wasserbad überführt zu werden. Dort wurden die DNA-Fragmente bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

Annealing Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂

3.1.5 Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP

Die radioaktive 5' Endmarkierung von Oligonukleotiden und DNA-Leiter wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs; Frankfurt am Main) durchgeführt. Das Enzym katalysiert die Übertragung einer mit [$\gamma^{32}\text{P}$] markierten Phosphatgruppe des ATP auf die 5' terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotids bzw. der DNA-Leiter. Für die Markierung wurden 100 pmol des Oligonukleotids und 5 µg der DNA-Leiter in einem 50 µl Ansatz mit 20 units der T4-Polynukleotidkinase und 25 µCi des [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP unter den entsprechenden

Pufferbedingungen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert.

Die Aufreinigung der markierten DNA von nicht eingebauten Nukleotiden erfolgte mit dem „Nucleotide Removal Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Aktivität der Probe und somit die Qualität des Einbaus wurde durch Messung von 2 µl in einem Szintillationsmessgerät bestimmt.

T4 PNK Puffer: 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol; pH 7,6

3.1.6 Standard-PCR

Der Nachweis transgener Informationen während der Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch Polymerase Kettenreaktion (PCR). Solche Standard-PCR Anwendungen wurden nach den Protokollen von McPherson et al. (1991) angewendet. Soweit nicht anders erwähnt, wurden PCRs in einem Volumen von 25 µl mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

5´ Primer	10 pmol
3´ Primer	10 pmol
PCR-Puffer	1x
Nukleotid-Mix	jeweils 0,2 mM
DNA-Polymerase	0,65 u

Die verwendete Menge an DNA war bei den verschiedenen PCR-Verfahren unterschiedlich. Für die Genotypisierung von Mausschwanz-DNA wurde 1 µl der aufgereinigten DNA eingesetzt. Bei mehr als einer Reaktion wurde grundsätzlich ein so genannter Master Mix erstellt, der alle oben genannten Komponenten enthielt und dann anschließend zu der DNA pipettiert wurde. Die PCR-Reaktion wurde in PCR-Maschinen der Firma Biometra (Göttingen) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Methoden

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	94 °C	2 Minuten
Denaturierung		94 °C	30 Sekunden
Annealing	30–35	50–65°C	30 Sekunden
Extension		72 °C	1 Minute / kb
Schlussexension	1	72 °C	2 Minuten

Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz mit 6x Ladepuffer gemischt und zur Analyse auf einem Agarosegel aufgetragen.

3.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente erfolgte nach dem Kettenabbruch-Verfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) unter der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden.

Die Sequenzreaktion wurde mit dem „Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing“-Kit (Applied Biosystems; Darmstadt) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen und die Aufreinigung der Proben erfolgten nach Herstellerangaben. Die Sequenzreaktion wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	96 °C	1 Minute
Denaturierung		96 °C	30 Sekunden
Annealing	30–35	45–59°C	15 Sekunden
Extension		60 °C	4 Minuten
Pause	1	16 °C	∞

Die Auftrennung und Analyse der Proben erfolgte in einem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer Kapillarsequenzier-Gerät der Firma Applied Biosystems.

Ein Homologie-Vergleich der Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt.

3.1.8 Acrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung radioaktiv markierter PCR-Produkte während der 3C-Analyse erfolgte auf einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 5 Minuten in Essigsäure fixiert, auf 3MM Whatman-Papier übertragen und unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde über Nacht auf einem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film „Super RX“; Fujifilm) bei -80°C exponiert.

Acrylamidgel: 37,5 ml H₂O, 5 ml 10x TBE, 7,5 ml Acrylamid 19:1, 80µl TEMED, 250 µl APS

1x TBE-Puffer: 89 mM Tris-HCl (pH8,0), 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

6x Ladepuffer: 10 mM Tris-HCl (pH7,6), 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylenxanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA (Fermentas, St. Leon Rot)

3.1.8.1 Längenstandards

Die Größenbestimmung untersuchter DNA-Fragmente während der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte durch paralleles Auftragen von Längenstandards. In Abhängigkeit der Größe der DNA-Fragmente wurden die 1kb- und die 100bp-Größenmarker der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) verwendet. Zusätzlich wurde für DNA-Fragmente mit einer Größe von über 10 kb mit *HindIII* geschnittene λ-DNA verwendet.

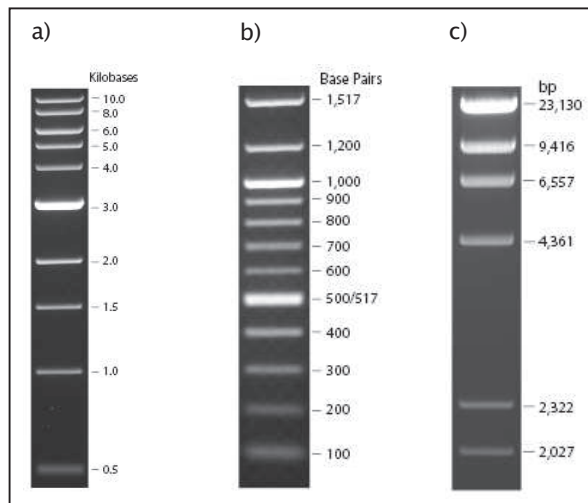


Abb. 3.1: Darstellung der verwendeten Größenmarker. a) 1 kb DNA-Leiter der Firma NEB auf einem Ethidiumbromid gefärbten 0,8% TAE-Agarosegel. b) 100 bp DNA-Leiter der Firma NEB auf einem Ethidiumbromid gefärbten 1,3% Agarosegel. c) λ DNA-HindIII Digest DNA Marker der Firma NEB auf einem Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarose Gel.

3.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von 10 kb aus Agarose Gelen wurde das „Nucleospin Extract II Kit“ (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben genutzt.

DNA-Fragmente mit einer Größe über 10 kb und alle für die Pronukleusinjektion eingesetzten Konstrukte wurden mittels Elektroelution im Dialyseschlauch in 1xTAE aus dem Agarosegel isoliert. Die Elution erfolgte bei einer Spannung von 100V für 1 Stunde. Die DNA-Lösung wurde durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und durch Zugabe von 1/10 Vol. Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol gefällt. Die getrocknete DNA wurde in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer resuspendiert.

3.2 Arbeiten mit RNA

3.2.1 Lagerung

Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80°C in RNase freiem Wasser.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe

Alle Arbeitsschritte für die Präparation von RNA wurden auf Eis durchgeführt. Außerdem wurden ausschließlich doppelt autoklavierte Gebrauchsmaterialien verwendet. Die Entnahme der embryonalen Gewebestücke fand unmittelbar *post mortem* statt. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das „peqGOLD RNAPure™“ – Reagenz (peqLab) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde in sterilem, RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260nm bestimmt.

3.2.3 5´ RACE-PCR (*5´ rapid amplification of cDNA ends*)

Die 5´ RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*) ist eine spezielle Variante der RT-PCR, mit der eine spezifische Amplifikation der 5´ Enden von cDNAs und somit eine Bestimmung des transkriptionellen Starts des zu untersuchenden Gens ermöglicht wird. Hierbei wurde die SMART™-Technologie (*Switching Mechanism at 5´ end of RNA Transcript*) der Firma Clontech angewendet. Diese Technologie verzichtet auf einen Gebrauch von Adapter-Ligationen, wie er bei herkömmlichen 5´ RACE Protokollen der Fall ist und ermöglicht den direkten Gebrauch von Erststrang-cDNA für die RT-PCR.

Für die Herstellung von Erststrang-cDNA für die 5´ RACE wurden 2 µg Gesamt-RNA zusammen mit 10 pmol eines genspezifischen Primers und 12 pmol des SMART II™ A Oligonukleotids für 2 Minuten bei 70 °C erhitzt. Während der anschließenden 10-minütigen Abkühlung bei Raumtemperatur konnte sich der genspezifische Primer an die entsprechende mRNA anlagern. Durch die Zugabe von 2 µl 5x First-Strand Buffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und 1 µl Prime Script Reverse Transcriptase wurde die Erststrangsynthese gestartet und für 90 Minuten bei 42 °C durchgeführt. Die Prime Script Reverse Transkriptase, der eine terminale Transferase Aktivität fehlt, fügt der synthetisierten cDNA

einen zusätzlichen Anhang von 3–5 Cytosin-Nukleotiden an, an welchen sich das SMART-Oligo, welches einen terminalen Abschnitt mit mehreren Guanin-Resten besitzt, anlagern kann und somit als erweitertes Template für die RT-PCR dient. In der folgenden PCR dient das SMART-Oligo als Anlagerungsstelle für einen Universellen Primer. Nach einer Zugabe von 100 µl Tricine-EDTA wurde die Reaktion durch ein Erhitzen bei 72 °C für 7 Minuten gestoppt.

Aus diesem Ansatz wurde in der Folge direkt 2,5 µl für die PCR zusammen mit den entsprechenden Komponenten gemischt:

- 32,5 µl dH₂O
- 5 µl Polymerase Puffer
- 2 µl dNTPs (jeweils 2,5 mM)
- 5 µl Universal Primer Mix
- 1 µl genspezifischer Primer
- 0,2 µl rTaq (Takara)

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	94 °C	2 Minuten
Denaturierung		94 °C	30 Sekunden
Annealing	35	63°C	30 Sekunden
Extension		72 °C	1 Minute
Schlussexension	1	72 °C	2 Minuten

Für eine anschließende nested-PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes mit 240 µl Tricine EDTA verdünnt. 5 µl der Verdünnung wurde mit den Primern NUP (nested universal Primer) und GPS2 mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Methoden

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	94 °C	2 Minuten
Denaturierung		94 °C	30 Sekunden
Annealing	30	60°C	30 Sekunden
Extension		72 °C	45 Sekunden
Schlussexension	1	72 °C	2 Minuten

Die RACE-PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Für die nachfolgende Analyse wurden die Amplifikate in einen pGEM®-T Easy Vektor kloniert und sequenziert.

3.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

Für das Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien wurden ausschließlich sterile Puffer, Medien, Glasgeräte und Zentrifugenröhrchen verwendet. Alle Kultivierungsarbeiten erfolgten in einer Sicherheitswerkbank nach Standard-Protokollen.

3.3.1 Transfektion

Für die Transfektion der Reportergenkonstrukte wurden am Tag des Experiments $1,5 \times 10^5$ C3H/10T1/2-Zellen in einer 6-well Gewebekulturschale ausgesät. Die Transfektion wurde mit 2 µg DNA mit dem polykationischen Transfektionsreagenz Metafectene™ (Biontex) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis der Reportergenaktivität erfolgte nach 48 Stunden.

DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium): PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

1x PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4

Trypsin-EDTA: 5 mg/ml Trypsin, 2,2 mg/ml EDTA, gelöst in PBS

3.4 Herstellung transgener Mäuse

Transgene Mäuse wurden mittels Pronukleusinjektion (Hogan et al., 1994) hergestellt. Hierzu wurde die DNA in die Vorkerne von befruchteten Eizellen im Einzellstadium eingebracht. Die DNA-Konstrukte integrieren in einer nicht-gerichteten Weise in das Genom der Eizellen. Nachdem die Zellen in den reproduktiven Trakt eines Ammentieres transferiert wurden, können sich die Embryonen normal entwickeln und ausgetragen werden. Aus den transgenen Foundertieren wurden Linien generiert. Die unter 3.4.3 und 3.4.4 beschriebenen Arbeiten der Mikroinjektion wurden von Dr. Astrid Buchberger und Friederike Kruse durchgeführt.

3.4.1 Aufarbeitung der zu injizierenden DNA

Für die Mikroinjektion wurden die DNA-Konstrukte ohne Vektorrückgrat in linearer Form verwendet. Die Vektorsequenz wurde in allen Konstrukten durch einen NotI-Verdau entfernt. Die verdaut DNA wurde auf einem 0,7 – 1%igen Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetrennt und mittels Elektroelution aus der Agarose eluiert. Die gesammelte DNA wurde mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Anschließend erfolgte eine zweite Aufreinigung mit einer ProbeQuant™ G-50 Säule (GE Healthcare). Nach einer weiteren Ethanol-Fällung wurde die DNA dreimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 0,1x TE-Puffer resuspendiert. Das Fragment wurde für die Mikroinjektion auf eine Konzentration von 1–2 ng/μl in 0,1x TE-Puffer verdünnt und durch einen Ultrafree-MC Centrifugal 0,22μm Filter filtriert.

3.4.2 Superovulation von Mäusen

Durch eine Hormongabe an fertilen Spendertieren konnte die Anzahl an ovulierten Eizellen erhöht werden. Bei dieser so genannten Superovulation wurde den Mäuseweibchen jeweils 5 IU der Gonadotropine PMSG (*Pregnant Mare's Serum*) und hCG (*human chorionic Gonadotropin*) intraperitoneal injiziert und anschließend verpaart. Die PMS-Injektion erfolgte 56 Stunden und die hCG-Injektion 24 Stunden vor Eizellentnahme.

Um eine optimale Wirkung der Hormone zu erzielen, wurden die Injektionen in Abhängigkeit des Tag/Nacht Rhythmus der Tiere am frühen Nachmittag durchgeführt. Die Verpaarung der hormonbehandelten Tiere erfolgte am Tag der hCG-Gabe. Die Fertilisation der Spendertiere wurde am nächsten Morgen anhand des Vaginalpfropfes überprüft.

PMSG: Intergonan (Intervet)

hCG: Ovogest (Intervet)

3.4.3 Isolation der befruchteten Eizellen

Fertilisierte Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Isolierung der Eizellen aus dem Ovidukt erfolgte in M2-Medium, wo sie nach einer 3 bis 5-minütigen Inkubation mit Hyaluronidase (300µg/ml) von dem sie umgebenen Kumuluszellen freigesetzt wurden. Nach drei Waschschritten in M2-Medium wurden die Eizellen in M16-Medium überführt und mit Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Eizellen wurden bis zur Injektion in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Hyaluronidase:	H-3506	Sigma
M2-Medium:	M-7167	Sigma
M16-Medium:	M-7292	Sigma
Mineralöl:	M8410	Sigma

3.4.4 Mikroinjektion der DNA und Transfer der Eizellen

Die Mikroinjektion in Vorkerne der Eizellen erfolgte mit einem Eppendorf Transjektor 5246 unter einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Die Injektion erfolgte in den größeren, männlichen Vorkern. Injizierte Eizellen wurden am gleichen Tag in den Ovidukt narkotisierter scheinschwangerer Ammentiere (E 0,5) transferiert.

Avertin: 10g 2,2,2-Tribromethy Alkohol werden in tert-amyl-Alkohol gelöst, um eine 100%ige Stammlösung herzustellen

3.5 Analyse transgener Mäuse

3.5.1 Präparation von Embryonen und Gewebe

Die trächtigen Weibchen wurden durch eine Vergasung mit CO₂ getötet. Anschließend wurde die Bauchdecke durch einen medialen Schnitt geöffnet und der Uterus entnommen. Die Embryonen wurden in PBS unter einem Binokular aus dem Uterus präpariert.

3.5.2 Histochemische Färbemethoden

Zum Studium des Expressionsmuster der transgenen Mäuse wurden die Reportergene des Enzyms *β-Galaktosidase (LacZ)* und der human *plazentalen Alkalischen Phosphatase (AP)* verwendet. Für jedes untersuchte Transgen wurden mehrere transiente Embryonen und/oder unterschiedliche Embryonalstadien erzeugter Linien betrachtet.

3.5.2.1 LacZ-Färbung

Nach der Isolierung wurden die Embryonen zunächst in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in Glutaraldehyd-haltiger Lösung fixiert. Die Fixierung erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte in Abhängigkeit der Größe der Embryonen zwischen 5 und 15 Minuten. Nach dreimaligem Waschen der Embryonen für ca. 30 Minuten erfolgte die Färbung für 1–24 Stunden bei RT. Nach erfolgter Anfärbung der Embryonen wird die Färbereaktion durch erneutes Waschen gestoppt. Die Embryonen können nun in der Waschlösung bei 4 °C gelagert werden.

10x PBS-Puffer: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ (auf 1000 ml)

Fixierlösung: 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2% Glutaraldehyd; in PBS

Waschlösung: 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,01% Natrium Desoxycholat, 0,02% Nonidet P-40; in PBS

Färbelösung: 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 0,1% X-Gal; in Waschlösung

3.5.2.2 AP-Färbung

Zum *whole mount*-Nachweis der *Alkalischen Phosphatase* in den generierten Reporter-mäusen wurden die isolierten Embryonen zunächst in der Fixierlösung ihrer Größe entsprechend bei RT inkubiert. Embryonen der Entwicklungsstufen E9,5 und E10,5 wurden für 5 Minuten fixiert, ältere Embryonen mit dem Alter E11,5 und E12,5 wurden bis zu 15 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Embryonen zweimal in PBSA/2mM MgCl₂ für jeweils 10 Minuten gewaschen. Während einer Hitzebehandlung für 1 Stunde bei 65 °C in PBSA/2mM MgCl₂ wurden endogene Alkalische Phosphatasen inaktiviert. Es folgte ein zweifacher Waschschrift in AP-Puffer und eine Äquilibration der Embryonen in AP-Puffer für bis zu 45 Minuten. Nach Zugabe der Färbelösung wurden die Embryonen im Dunkeln für 24–48 Stunden unter Schütteln gefärbt. Nach erfolgter Färbung wurde die Reaktion durch dreimaliges Waschen mit LacZ-Waschlösung gestoppt.

PBSA: Ca/Mg-freies PBS; 0,02% NP-40

Fixierlösung: 0,2% Glutaraldehyd in PBSA

AP-Puffer: 100 mM Tris pH9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween 20, 2 mM Levamisole

AP-Färbelösung: BM Purple AP Substrat (Roche)

3.5.3 Vibratomschnitte

Die zu schneiden Embryonen wurden nach der Färbung über Nacht in 4% Paraformaldehyd postfixiert und am nächsten Tag in Ei-Albumin-Blöcken eingebettet. Dazu wurden sie über Nacht bei 4°C in Ei-Albumin vorinkubiert. Die Einbettung des Embryos erfolgte in einer Mischung aus 2 ml Ei-Albumin und 240 µl Glutaraldehyd in einer speziellen Einbettform. Die Polymerisation erfolgt für mindesten zwei Stunden bei RT. Die Embryonen wurden an einem Leica VT 1000E Vibratom mit einer Schnittdicke von 20 – 60 µm geschnitten.

3.6 Nachweis von Chromatin-Interaktionen über Chromosome Conformation Capture

Die Technik des Chromosome Conformation Capture (3C) ermöglicht die hochauflösende Analyse komplexer dreidimensionaler Chromosom-Organisation durch eine PCR-basierte Detektion von miteinander interagierenden chromosomalen Fragmenten *in vivo* (Dekker et al., 2002). Die 3C-Analyse von murinem Gewebe wurde nach einer modifizierten Version der publizierten Protokolle durchgeführt. (Dekker, 2002; Tolhuis et al, 2002; Current Protocols in Molecular Biology, Unit 21.11). Bei der Wahl des Restriktionsenzymys wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Schnittstellen im untersuchten genomischen Abschnitt geachtet. Die detektierten Restriktionsfragmente besaßen eine Größe zwischen 1 und 10 kb, da zu große bzw. zu kleine Fragmente in der Interaktions-Frequenz variieren können. Während des Designs der Primer wurde darauf geachtet, dass sie nicht weiter als 250 bp von der Restriktionsschnittstelle entfernt liegen. Die Primer haben eine durchschnittliche Länge von 28 Nukleotiden, besitzen einen GC-Gehalt von 40 – 60% und haben ähnliche Schmelztemperaturen. Die verwendeten Primerkombinationen wurden mit einem Kontroll-Template getestet und Paare, die unterschiedliche Mengen an PCR-Produkt lieferten oder multiple Banden erzeugten, wurden verworfen und erneut geplant.

3.6.1 Herstellung eines 3C-Templates aus murinem Gewebe

Zur Entnahme der Embryonen wurden schwangere Mäuse durch Begasung mit Kohlendioxid getötet. Den Tieren wurde mit einer Schere das Bauchfell geöffnet und der Uterus mit den darin enthaltenen Embryonen herauspräpariert und in eiskaltes 1x PBS überführt. Anschließend erfolgte die Sektion der Embryonen unter einem Binokular. Für die Präparation von Extremitätengewebe wurden Embryonen der Stadien E11,5 und E12,5 verwendet. Hierzu wurden die Extremitätenknospen von fünf bis zehn Embryonen isoliert und in einem Reaktionsgefäß mit kaltem PBS gesammelt. Die Präparation von Somiten erfolgte an Embryonen der Stadien E10,5 und E11,5. Diese Embryonen wurden dekapitiert und die Extremitäten und Organe entfernt. Anschließend wurden die Gewebe mit einer Schere grob zerkleinert, mehrmals mit PBS gewaschen und durch eine

Inkubation mit 0,25% Trypsin für 15 Minuten bei 37 °C unter stetigem Schütteln aus dem Gewebeverband dissoziiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM/10% FCS (v/v) gestoppt und die Zellen durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße separiert. Nach der Zellzahlbestimmung der Einzelzellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer wurden diese für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und in 10 ml PBS/10% FCS (v/v) resuspendiert. Die Zugabe von 270 µl 37% (v/v) Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 1% führt während der 15-minütigen Inkubation zur Quervernetzung der Protein-Protein und Protein-DNA Wechselwirkungen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Glycin zu einer Endkonzentration von 0,125 M gestoppt und nach einer Inkubation von 5 Minuten bei RT und 15 Minuten auf Eis, für 5 Minuten bei 400 x g und 4°C pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml eiskaltem Lyse-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte während einer Inkubation für 15 Minuten auf Eis und einer anschließenden mechanischen Behandlung mit einem Dounce Homogenisator mit Pistill B. Die frei gewordenen Zellkerne wurden mit einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 x g pelletiert und in 2 ml Restriktionspuffer resuspendiert. Das Nukleolemma wurde durch die Zugabe von 60 µl 10% (v/v) SDS während einer Inkubation von 60 Minuten bei 37 °C unter Schütteln aufgeschlossen. Das SDS wurde durch die Zugabe von 360 µl 10 % Triton gebunden und mit einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt entfernt. Das Chromatin wurde in frischem Restriktionspuffer resuspendiert und $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden in einem 2 ml Restriktionsansatz durch Zugabe von 400 U BspHI über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln verdaut.

Die Inaktivierung des Restriktionsenzym erfolge am darauf folgenden Tag durch eine 30-minütige Hitzebehandlung bei 65 °C. Die verdauten Nuklei wurden in Ligationspuffer zu einer Endkonzentration von ca. 2,8 ng DNA/µl verdünnt und nach Zugabe von 10 µl T4 DNA Ligase (400 U) für 4 Stunden bei 16 °C ligiert. Durch die Verdünnung der DNA-Konzentration konnte die Ligation von intramolekularen vernetzten Fragmenten gegenüber willkürlichen intermolekularen Fragmenten gefördert werden. Die Vernetzung der Protein-DNA Komplexe wurde durch eine Inkubation bei 65 °C in Anwesenheit von 100 µg/ml Proteinase K aufgelöst und die DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt.

In parallelen Ansätzen wurden die Kontrollen ohne Formaldehyd-Behandlung, ohne T4 DNA Ligase sowie aus nicht-exprimierenden Leber-Gewebe aufgearbeitet.

Trypsin: 2,5 g/L Trypsin (1:250), 0,38 g/L EDTA in Hanks´ Balanced Salt Solution

2,5 M Glycin: 18,768 g in 100 ml H₂O

Lyse Puffer (frisch ansetzen): 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0,2% (v/v) NP-40, 1 Tablette Proteinase Inhibitor (Complete Mini, Roche)

Ligase Puffer (frisch ansetzen): 500 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 MgCl₂, 100 mM Dithiothreitol, 10 mM ATP

3.6.2 Herstellung eines 3C-Kontroll Templates und Normalisierung der Primer-Effizienz

Jeder Nachweis einer Interaktion zweier genomischer Loci benötigt ein eigenes Primerpaar. Um die Häufigkeit der Interaktion unterschiedlicher Loci miteinander vergleichen zu können, mussten die Effizienzen der verschiedenen Primerkombinationen normalisiert werden. Dazu wurde ein „Kontroll-Template“ hergestellt, welches alle möglichen Ligationsprodukte des genomischen Lokusses in äquimolaren Verhältnissen enthielt. Aufgrund der Größe des Maus-Genoms und der daraus resultierenden Komplexität der Ligationsprodukte, wurde für dieses Kontroll-Template ein BAC-Klon (RP23-113D5; CHORI) verwendet, welcher die genomische Region repräsentiert (Tolhuis et al., 2002; Palstra et al., 2003). Der verwendete BAC-Klon beinhaltet die *Myf5*-Region von -163 kb bis + 41 kb.

Als Ausgangsmaterial für das Kontroll-Template dienten 20 µg aufgereinigte BAC-DNA, die in einem 2 ml -Ansatz mit 40 U BspHI über Nacht bei 37°C verdaut wurde. Nach dem Verdau wurde die DNA mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit einer Ethanol-Fällung präzipitiert. Die pelletierte und gewaschene DNA wurde kurz bei Raumtemperatur angetrocknet und anschließend in 161 µl ddH₂O resuspendiert. Für eine Überprüfung der Verdau- und Ligationseffizienz wurden von dieser DNA 4 µl für ein späteres Agarosegel entnommen. Die Ligation der restlichen DNA erfolgte über Nacht bei 16 °C.

157 µl DNA
 20 µl 10x Ligations Puffer
 2 µl BSA (10mg/ml)
 2 µl ATP (100mM)
 4 µl T4 Ligase (1600 cohesive end units)
 15 µl H₂O

Die Inaktivierung der Ligations-Reaktion erfolgte durch eine Inkubation bei 65 °C für 15 Minuten. Die ligierten DNA-Fragmente wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert und in 100 µl 10 mM Tris resuspendiert. Die Kontrolle der Reaktionseffizienzen erfolgte auf einem 0,8%igen Agarosegel, indem 100 ng der unverdauten BAC-DNA sowie 4 µl der verdauten und 1 µl der ligierten DNA aufgetragen wurde.

Für die nachfolgende Normalisierung der Primer-Effizienzen wurde das Kontroll-Template in den Verdünnungen 1:100 und 1:100.000 eingesetzt. Die 1:100.000 Verdünnung steht in einem äquimolaren Verhältnis zu den untersuchten 3C-Templates. Die amplifizierten Produkte konnten hierbei nur noch über eine radioaktive nested PCR mit anschließender Auftrennung der Fragmente auf einem Acrylamidgel nachgewiesen werden.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem 50 µl Standard-Reaktionsansatz unter den unten aufgeführten Reaktionsbedingungen. Die Amplifikation wurde mit der rTaq™ der Firma Takara Bio Inc. durchgeführt.

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	94 °C	2 Minuten
Denaturierung		94 °C	30 Sekunden
Annealing	30	60°C	30 Sekunden
Extension		72 °C	60 Sekunden
Schlussexension	1	72 °C	2 Minuten

Für die nested-Amplifikation der äquimolaren Verdünnung wurden 5 µl der PCR-Produkte eingesetzt. Die Extensionszeit wurde auf 45 Sekunden verkürzt. Nach 30 Amplifikationszyklen wurden 10 µl des Reaktionsansatzes auf einem 6 %igen Acrylamidgel aufgetrennt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die molekularen Mechanismen, welche die selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch dessen Enhancer regulieren, untersucht. Bisherige Untersuchungen des *Mrf4/Myf5*-Genlokus konzentrierten sich im Wesentlichen auf die Kartierung und Charakterisierung von regulatorischen Elementen. Durch die Verwendung transgener YAC- und BAC-Reportergentechnik konnte die Regulation beider Gene im Kontext des gesamten Genlokus betrachtet werden und die Deletion größerer DNA-Bereiche lieferte Informationen über deren Funktion durch den Verlust der transgenen Aktivität (Zweigerdt et al., 1997; Hadchouel et al., 2000; Summerbell et al., 2000; Carvajal et al., 2001; Teboul et al., 2002; Hadchouel et al., 2003). Im Gegensatz zu dieser „loss-of-function“ Strategie wurden nachfolgend minimale Sequenzabschnitte ermittelt, durch die über einen Gewinn der Expression spezifisch Promotoren aktiviert werden konnten (Summerbell et al., 2000; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2002; Buchberger et al., 2003; Hadchouel et al., 2003; Teboul et al., 2003; Chang et al., 2004; Fomin et al., 2004). Dieser so genannte „gain-of-function“ Ansatz ermöglicht es, die Funktion von genau definierten Elementen zu charakterisieren. Detaillierte Untersuchungen, die erklären, wie die spezifische Interaktion einzelner Enhancer mit dem *Myf5*-Promotor realisiert wird, wurden bislang nicht durchgeführt.

In jüngerer Zeit konnte durch Studien verschiedener Genloki in *Drosophila* und Maus verdeutlicht werden, wie selektive Promotoraktivierung vermittelt werden kann (Palstra et al., 2008; Maeda and Karch, 2009). Die in der Einleitung beschriebenen Mechanismen der Promotor-Inkompatibilität, Promoter-Tethering und das Abschirmen von Enhancer-Einflüssen durch Insulatoren stellten auch im untersuchten Genlokus Möglichkeiten zur Selektion dar und lieferten einen konzeptionellen Rahmen für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente im *Mrf4/Myf5*-Genlokus.

Meine Analysen der selektiven Promotor-Enhancer Interaktionen konzentrierten sich auf den frühen epaxialen Enhancer (EEE) und den -58/-56 kb Enhancer, die *in vivo* vermutlich nur den *Myf5*-Promotor aktivieren, obwohl sie näher zum *Mrf4*-Promotor lokalisiert sind. Für beide Enhancer wurde eine Serie von Einzel- und Doppelreporterkonstrukten erstellt, die in transgenen Mäusen

analysiert wurden (siehe Abb. 4.1). Dadurch konnte die individuelle Aktivierung des *Mrf4*- und des *Myf5*-Promotors zeitgleich untersucht werden.

Als Reportergene wurden die bakterielle β -Galaktosidase (LacZ) und die humane *alkalische Phosphatase* (AP) verwendet, die jeweils im Leseraster der Gene *Mrf4* bzw. *Myf5* im Exon 1 inseriert wurden. Die Aktivität der Reportergene wurde durch histochemische Anfärbungen dokumentiert. Um Integrationseffekte auf die Expression der Transgene auszuschließen, erfolgte die Analyse in mehreren transienten Embryonen und in stabilen transgenen Linien. Die Konstrukte zeigten in den unabhängigen transgenen Embryonen ein konsistentes Muster (Tabelle 4.1). Vereinzelt konnte integrationsbedingte ektopische Expression festgestellt werden.

Die Untersuchungen des EEE zeigten, dass ein 15 kb Ausschnitt des genomischen Lokus in der Lage ist, die *in vivo* Regulation widerzuspiegeln (APZ-1). Ausgehend von diesem Konstrukt sollten durch sukzessive Deletion genomische Abschnitte identifiziert werden, durch die die Selektivität des Enhancers vermittelt wird (EE1 bis EE-11; Abb. 4.1).

Der isolierte distale -58/-56 kb Enhancer wurde in vorangegangenen Experimenten zunächst in Einzelreporterkonstrukten vor dem *Mrf4*-Promotor untersucht (Fomin et al., 2004 und eigene Arbeiten). Während dieser Untersuchungen konnte kein Einfluss der Region -56 bis -20 kb auf die selektive Interaktion des Enhancers mit dem *Myf5*-Promotor beobachtet werden.

Ergebnisse

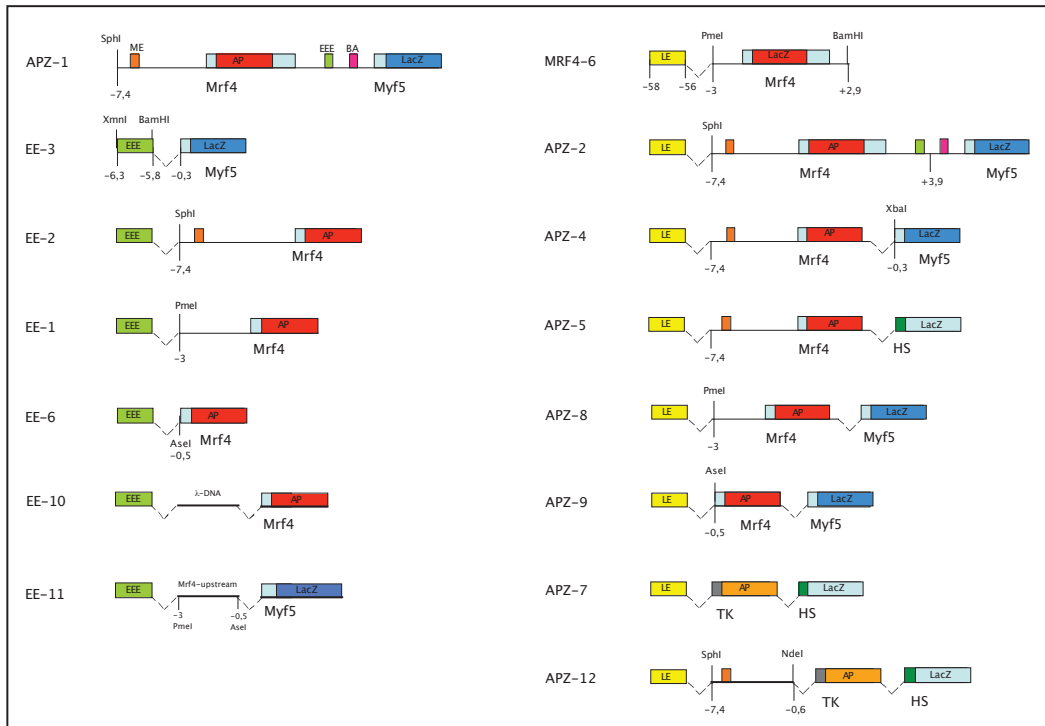


Abb. 4.1: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten transgenen Konstrukte. Der histochemische Nachweis der Transgen-Aktivität erfolgte über Anfärbungen der Embryonen, in denen die Reporterexpression der *Alkalischen Phosphatase* (AP) oder *β -Galaktosidase* (LacZ) nachgewiesen wurden.

Ergebnisse

Transgen	# Transient	# Linie	untersuchte Stadien						ektopisch
			E 8,5	E 9,5	E 10,5	E 11,5	E12,5	E 13,5	
APZ-1	4	2	8	2	2	6	n.b.	n.b.	0
EE-1	7	4	2	3	8	7	n.b.	n.b.	1 ^{3,4}
EE-2	1	4	3	5	4	4	n.b.	n.b.	0
EE-3	10	2	4	3	7	1	n.b.	n.b.	2 ^{1,2}
EE-6	15	/	2	3	8	3	n.b.	n.b.	3 ^{1,4}
EE-10	21	/	n.b.	3	7	13	n.b.	n.b.	5 ^{1,3,4}
EE-11	6	/	n.b.	3	1	2	n.b.	n.b.	3 ³
MRF4-6	2	2	n.b.	n.b.	6	3	6	3	0
APZ-2	4	3	n.b.	1	3	5	3	5	0
APZ-4	4	2	n.b.	1	3	6	2	1	0
APZ-5	4	1	n.b.	1	1	5	1	1	0
APZ-7	6	2	n.b.	2	2	6	4	2	0
APZ-8	3	2	n.b.	2	2	4	3	2	1 ⁵
APZ-9	3	3	n.b.	2	2	4	4	2	1 ⁵
APZ-12	7	5	n.b.	4	3	5	12	4	2 ⁵

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der transgenen Embryonen mit beobachteter Reporterexpression. Die Tabelle führt die Anzahl der untersuchten transgenen Embryonen auf. Während der histochemischen Analyse der Embryonen wurden unterschiedliche Ausprägungen der Expressionsstärke sowie verschiedene ektopische Expressionsdomänen beobachtet. 1: Mosaikmuster; 2: Neuronal; 3: Kopf; 4: Extremitäten; 5: Muster abweichend zu den weiteren untersuchten Embryonen; n.b.: nicht betrachtet

4.1 Untersuchungen zur Selektivität des *Myf5*-spezifischen Early Epaxial Enhancers

4.1.1 Das Muster der frühen myotomalen *Myf5*- und *Mrf4*-Expression kann durch ein transgenes Konstrukt rekonstruiert werden

Die Aktivierung von *Myf5* beginnt in der Maus am achten Tag der Embryonalentwicklung im epaxialen Dermomyotom neu gebildeter Somiten (Summerbell et al., 2000; Teboul et al., 2002). Die initiale Expressionsdomäne wird durch den Early Epaxial Enhancer gesteuert, welcher im Abstand von 5,8 kb zum *Myf5*-Promotor im intergenischen Bereich zwischen *Mrf4* und *Myf5* lokalisiert ist. Obwohl der Enhancer somit in etwa gleich weit von den beiden

Promotoren entfernt ist (Abb. 1.2), wird *der Mrf4*-Promotor durch den EEE nicht aktiviert.

Das transgene Konstrukt APZ-1 enthält mit dem ca. 15 kb umfassenden Bereich des *Mrf4/Myf5*-Genlokus den größten in dieser Arbeit verwendeten genomischen Abschnitt (Abb. 4.2). Dieser Sequenzbereich enthielt das *Mrf4*-Gen mit einem 7,4 kb großen Promotor-Fragment, den 8 kb intergenischen Bereich sowie den *Myf5*-Promotor. Als interne Kontrollelemente für die Expression der Reportergene dienten der *Mrf4*-spezifische myotomale Enhancer (ME), sowie der *Myf5*-spezifische Kiemenbogen-Enhancer (BA, Abb. 4.2).

Die Ergebnisse der transgenen Analysen von APZ-1 zeigten, dass durch den EEE nur der *Myf5*-Promotor angesprochen wurde. Die Aktivierung des *Myf5*-Promotors zeigte LacZ-positive Zellen in allen Somiten zwischen Embryonaltag E8,5 und E12,5 (Abb. 4.2, A-D). Transversale Schnitte eines 9 Tage alten Embryos zeigten, dass sich die Expression im jüngsten Somiten auf den dorsalen, epaxialen Anteil beschränkte (Abb. 4.2 I) und in älteren Somiten im Myotom nachweisbar war (Abb. 4.2 J und K).

Der *Mrf4*-Promotor wurde durch den EEE nicht angesprochen (Abb. 4.2 E-H). Die AP-positiven Zellen der Embryonen können auf die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch seinen myotomalen Enhancer zurückgeführt werden. Dieser vermittelt ab Tag E9,5 *Mrf4*-Expression im Myotom rostraler Somiten, welche sich ab E10,5 in caudaler Richtung ausweitete (Abb. 4.2 E, F). Am Embryonaltag E11,5 war transgene Expression im Myotom aller Somiten nachweisbar, und wurde ab E12,5 in cranio-caudaler Orientierung wieder herunter reguliert (Abb. 4.2 G, H; Fomin et al., 2004). AP-Expression in den jüngsten Somiten 9 Tage alter Embryonen war nicht nachweisbar (Abb. 4.2 E).

Das Transgen APZ-1 zeigte somit selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den EEE, welche die *in vivo* Situation rekapitulierte. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der verwendete Ausschnitt des Genlokus alle notwendigen Elemente enthält, welche für die selektive Promotoraktivierung durch den EEE erforderlich sind. Um diese Elemente zu identifizieren, wurden in den nachfolgenden Konstrukten definierte Sequenzbereiche deletiert.

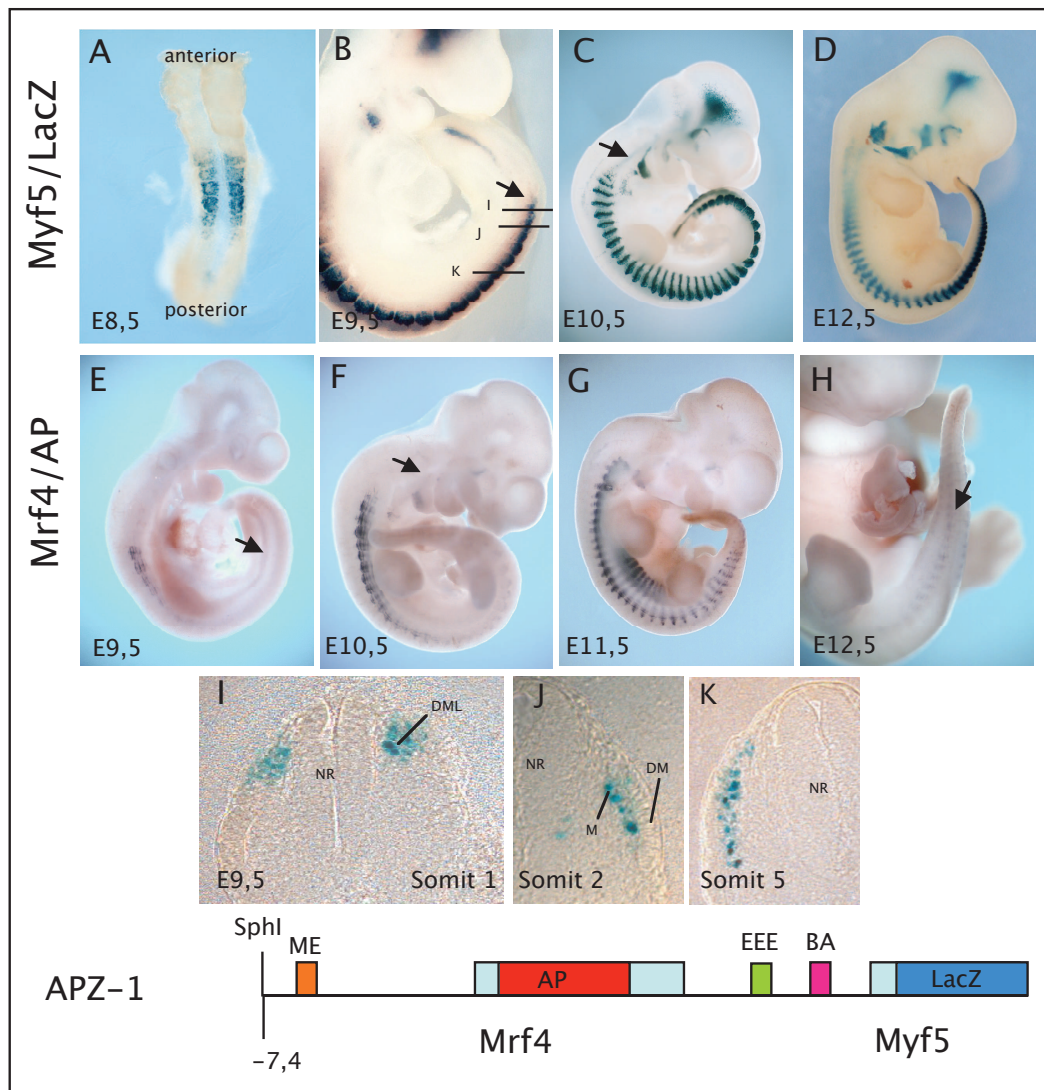


Abb. 4.2: Histochemische Anfärbungen transgener APZ-1 Embryonen. Durch den EEE hervorgerufene transgene LacZ-Aktivität ist, beginnend mit Tag E8,5 in allen Somiten nachweisbar (A-D). Die durch den myotomalen Enhancer (ME, orange) gesteuerte Aktivierung des *Mrf4*-Promotors rekapituliert das frühe *Mrf4*-Expressionsmuster (E-H). AP-positive Zellen in 12,5 Tage alten Embryonen sind nur in Somiten der Schwanzspitze zu detektieren (Pfeil in H). Es erfolgt keine Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch die *Myf5*-spezifischen BA- und EE-Enhancer. (vergleiche Pfeile in B und E, sowie C und F). BA: Kiemenbogen-Enhancer; DML: Dorso Mediale Lippe; DM: Dermomyotom; M: Myotom; NR: Neuralrohr

4.1.2 Ein 3 kb *Mrf4*-Promotor-Fragment ist für die selektive Promotoraktivierung des EEs ausreichend

Aus Untersuchungen von Fomin et al. (2004) ist bekannt, dass der EEE den *Mrf4*-Promotor auch dann nicht anspricht, wenn man das *Myf5*-Gen inklusive 3 kb der *Myf5*-upstream Sequenzen entfernt (Fomin et al., 2004). Um zu untersuchen, ob in der verbleibenden intergenischen Sequenz oder im *Mrf4*-Gen selbst abschirmende Elemente lokalisiert sind, wurde dieser Bereich in den folgenden Konstrukten deletiert. Um sicher zu stellen, dass der isolierte EEE die vollständige Aktivität vermittelt, wurde die Sequenz des EEs zunächst vor einem 300bp *Myf5*-Promotor-Fragment kloniert (Abb. 4.3). Der histochemische Nachweis dieses EE-3 Transgens zeigte, dass der isolierte Enhancer die frühe Expression von *Myf5* im epaxialen Dermomyotom rekapituliert (Abb. 4.3 A-E). Ab Embryonaltag E9,5 zeigte sich mit zunehmender Reifung der Somiten Ausweitung der Expressionsdomäne auf das angrenzende Dermomyotom (Abb. 4.3 E), während Mäuse mit einem LacZ Knock-In zu diesem Zeitpunkt eine auf die DML beschränkte Expression zeigen (Tajbakhsh et al., 1996). Diese ektopische Ausweitung der Expressionsdomäne konnte in früheren Arbeiten bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden (Summerbell et al., 2000; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al. 2002).

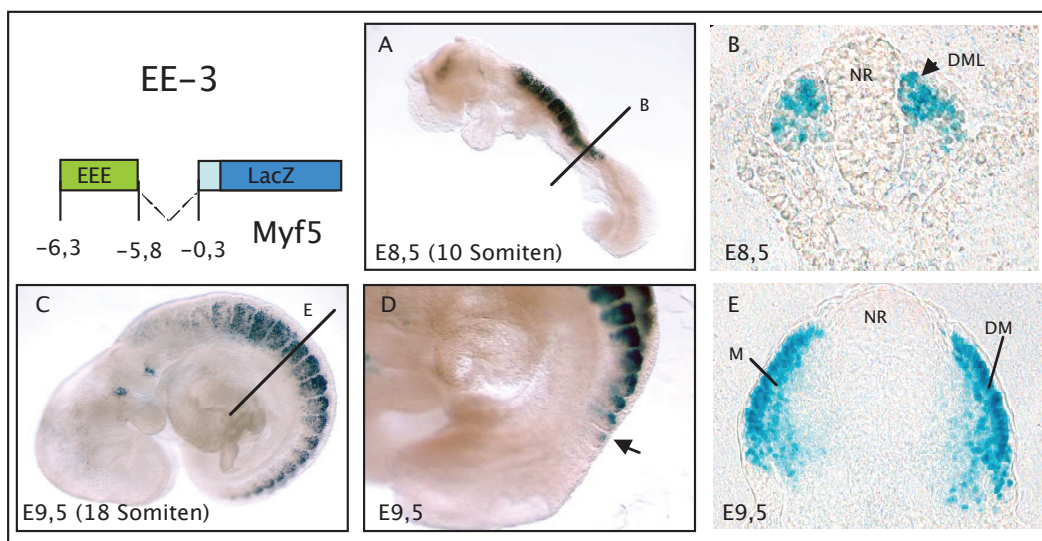


Abb. 4.3: Whole Mount Anfärbungen und transversale Schnitte transgener EE-3 Embryonen. Der isolierte Enhancer rekapituliert die initiale Aktivierung des *Myf5*-Promotors (A, C, D,). Transversale Schnitte verdeutlichen die Aktivierung des Transgens in

der dorsomedialen Lippe (DML, Pfeil in B) und die ventrale Ausweitung mit zunehmender Reifung der Somiten (E). Abbildungen C bis E zeigen das Expressionsmuster 9 Tage alter Embryonen. Deutlich zu erkennen ist die Aktivierung in den jüngsten Somiten (Pfeil in D). DM: Dermomyotom; M: Myotom; NR: Neuralrohr

Nach der Bestätigung der Promotoraktivierung durch den isolierten EEE wurde der Enhancer vor ein 7,4 kb (EE-2) bzw. 3 kb *Mrf4*-Promotor-Fragment (EE-1) kloniert (Abb. 4.4). Das verwendete Enhancer-Fragment wurde in früheren Arbeiten bereits untersucht und aktiviert neben dem homologen *Myf5*-Promotor auch verschiedene heterologe Promotoren (Summerbell et al., 2000; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2002). Die Untersuchungen der Transgene EE-2 und EE-1 zeigten, dass die Selektivität des Epaxialen Enhancers auch dann bestehen bleibt, wenn der intergenische Bereich und das *Mrf4*-Gen selbst aus den transgenen Konstrukten entfernt werden (Abb. 4.4). In keinem der Embryonen war die Expression des Reporters in jungen Somiten nachweisbar. Weder EE-2 noch EE-1 wiesen EEE-getriebene Aktivität auf. Die Aktivierung des Transgens erfolgte erst später während der Somiten-Entwicklung und kann nicht auf Aktivierung durch den EEE zurückgeführt werden (Abb. 4.4). In EE-2 transgenen Tieren erfolgte Reporter-Expression durch den myotomalen Enhancer im zentralen Bereich rostraler Somiten am Tag E 9,5 und folgte in späteren Stadien dem früher beschriebenen dynamischen Muster (Abb. 4.4 A-C; Fomin et al., 2004). Durch die Deletion der -7,4/-3 kb Region in Konstrukt EE-1, die auch den myotomalen Enhancer mit einbezog, waren AP-positive Zellen der transgenen Embryonen auf das epaxiale Myotom weniger cranialer Somiten beschränkt (Abb. 4.4 D-F). Diese Aktivierung wurde bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Fomin et al., 2004) und wurde durch basale Aktivität des 3 kb Promotorfragments vermittelt.

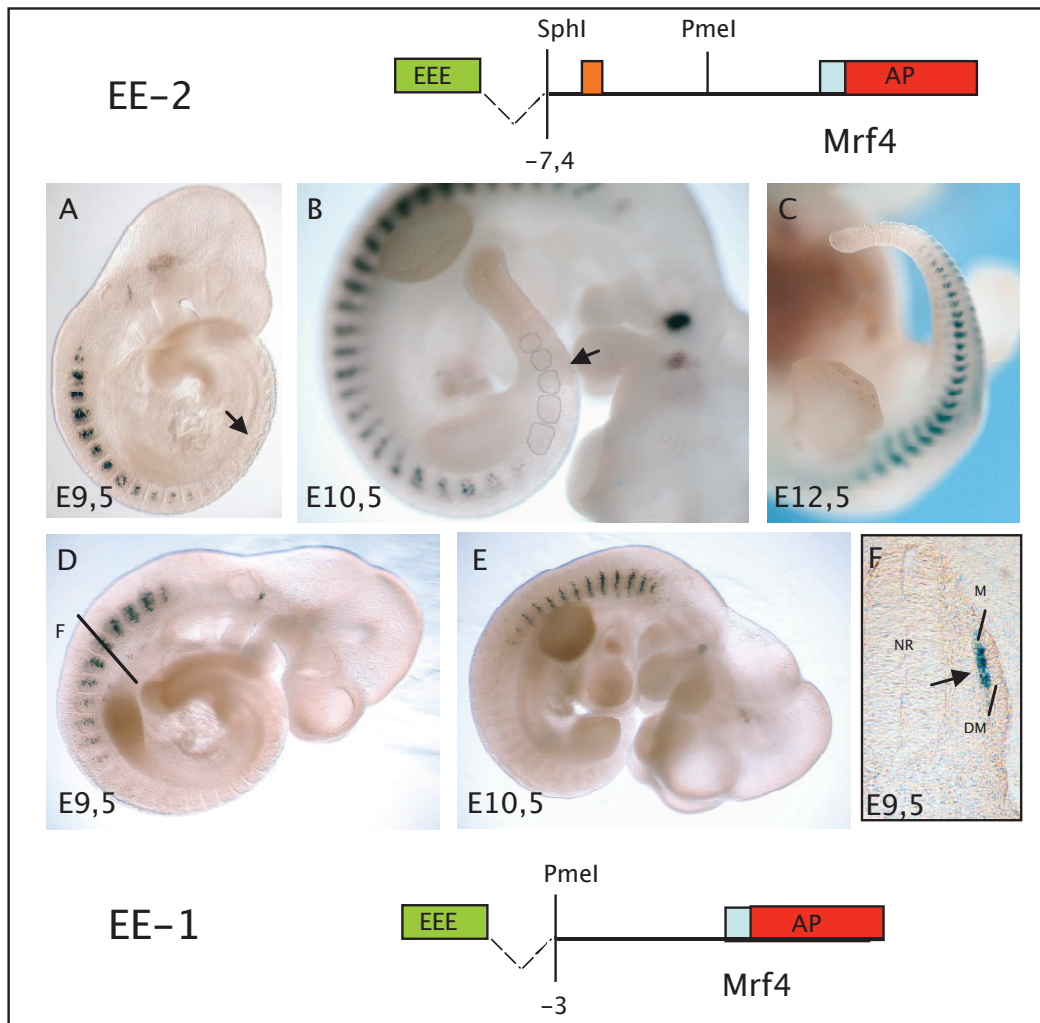


Abb. 4.4: Histochemische Anfärbungen transgener EE-2 (A-C) und EE-1 (D-F) Embryonen. AP-Färbung transgener EE-2 Embryonen tritt in Somiten der Embryonalstage E9,5 bis E12,5 auf (A-C). Das Muster folgt der Aktivierung durch den *Mrf4*-spezifischen myotomalen Enhancer (ME, orange). Aktivierung des Reportergens in transgenen EE-1 Embryonen erfolgt im epaxialen Myotom einiger cranialer Somiten (D-F). Frühere Aktivierung des *Mrf4*-Promotors in 8 Tage alten Embryonen sowie Expression in den jüngsten Somiten kann in beiden Konstrukten nicht nachgewiesen werden (Pfeil in A sowie B, D, E). Zum besseren Erkennen der jüngsten Somiten wurden diese in Abbildung B gekennzeichnet. DM: Dermomyotom; M: Myotom; NR: Neuralrohr

Sowohl die Deletion der intergenischen Sequenz als auch die Deletion von 4,4 kb des *Mrf4*-Promotorbereiches lösten die Bedingungen der selektiven Promotoraktivierung nicht auf. Das 3 kb *Mrf4*-Promotor Fragment schien somit für die Vermittlung der Selektivität ausreichend zu sein wodurch ein Einfluss

stromabwärts des *Mrf4*-Promotors gelegener Sequenzen ausgeschlossen werden konnte.

4.1.3 Ein Konstrukt mit 500 Nukleotiden des *Mrf4*-Promotors wird durch den EEE aktiviert.

In dem Konstrukt EE-6 wurden weitere 2,5 kb der *Mrf4*-Promotor Region deletiert. Dieses Konstrukt umfasste somit neben dem EEE noch 500 Basenpaare des *Mrf4*-Promotors (Abb. 4.5). Die Sequenz des verwendeten *Mrf4*-Promotors enthielt die notwendigen Elemente der basalen Transkriptionsbindungsstellen und ist für die *in-vitro* Transaktivierung durch myogene Transkriptionsfaktoren ausreichend (Black et al., 1995; Anhang).

Das Transgen EE-6 wurde im Dermomyotom transienter Embryonen der Entwicklungsstadien E8,5 bis E11,5 in einem Muster exprimiert, welches dem des *Myf5*-Promotors entsprach (Abb. 4.5). Am Tag E9,5 war zudem fortschreitende hypaxiale Ausweitung der Expression zu beobachten. Transversale Schnitte zeigten Aktivierung des Reportergens im epaxialen Bereich der Somiten. Damit vermittelt der direkt vor dem *Mrf4*-Promotor positionierte Enhancer ein Expressionsmuster, dass vergleichbar zu dem des isolierten *Myf5*-Promotors ist (Teboul et al., 2002; EE-3).

Dieses Ergebnis zeigte, dass die selektive Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch den EEE in den vorherigen Konstrukten durch die -3/-0,5 kb *Mrf4*-Region gesteuert wurde. Die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch den endogenen ME-Enhancer wurde durch dieses Element jedoch nicht beeinflusst, da die transgene Expression des Konstrukts EE-2 dem beschriebenen Muster des myotomalen Enhancers folgte, weshalb eine allgemeine Eigenschaft der Enhancer-Blockade für dieses Element unwahrscheinlich ist.

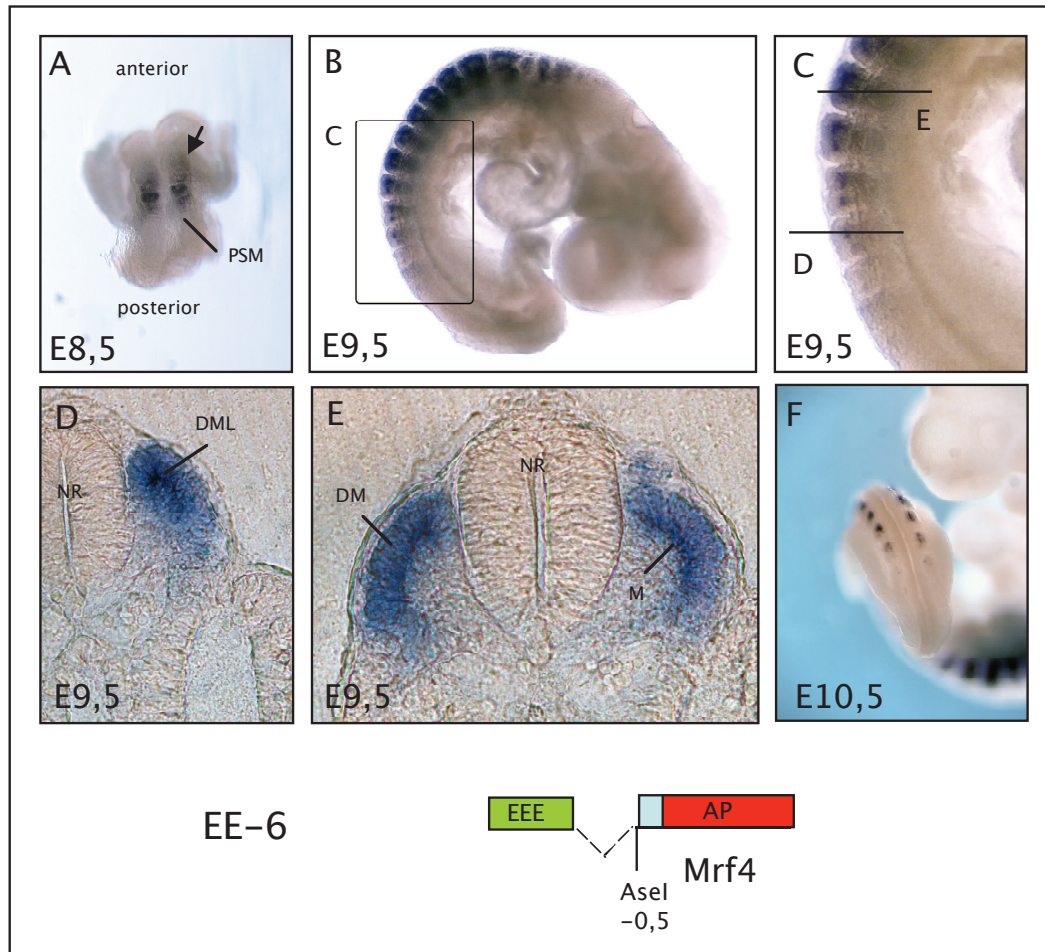


Abb. 4.5: Whole Mount AP-Färbungen transgener EE-6 Embryonen. Durch die Deletion des $-3/-0,5$ kb *Mrf4*-Bereichs konnte die Selektivität des EEEs aufgehoben werden. AP-Färbungen transgener Embryonen zeigen Reportergen-Aktivität in Somiten ab Embryonaltag E8,5 (A). Transversale Schnitte 9 Tage alter Embryonen verdeutlichen den Beginn der Expression im epaxialen Bereich junger Somiten (D). DML: Dorso Mediale Lippe; DM: Dermomyotom; M: Myotom; NR: Neuralrohr

Ob die Sequenz des 3 kb *Mrf4*-Promotorfragments die Enhancer-Selektivität auch im Kontext anderer Promotoren vermitteln kann, sollte durch das Konstrukt EE-11 untersucht werden. In diesem Konstrukt wurde die $-3/-0,5$ kb Sequenz zwischen epaxialen Enhancer und *Myf5/LacZ*-Promotor Fragment kloniert (Abb. 4.6). Abschirmende Eigenschaften der *Mrf4*-Sequenz sollten hier zu einem vollständigen Verlust der Promotoraktivierung führen. Die Analysen der transgenen Embryonen zeigten allerdings deutliche Reportergenexpression, die dem LacZ-Muster des Referenzkonstrukts EE-3 entsprach (Abb. 4.6 A-C). Die

Mrf4-upstream Sequenz konnte somit keine Blockierung der Promotor-Enhancer Interaktion vermitteln.

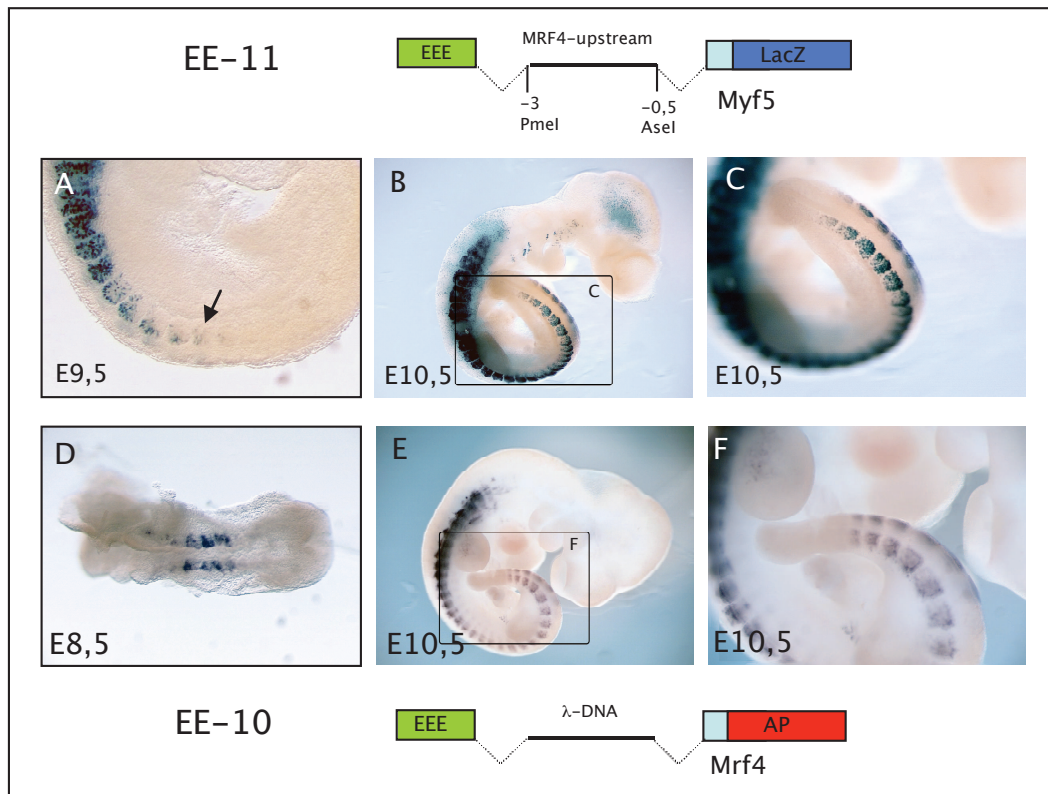


Abb. 4.6: Whole Mount Anfärbungen transgener EE-11 (A-C) und EE-10 (D-F) Embryonen. Nachweis der Reportergen-Aktivität erfolgte in beiden Konstrukten mit einsetzender Bildung der Somiten. Die Blockierung der Promotor-Enhancer Interaktion wird nicht durch Positions-Effekte beeinflusst (EE-11). Allerdings bleibt die Fähigkeit der -3/-0,5 kb *Mrf4*-upstream Region zur Realisierung selektiver Promotoraktivierung auf den *Mrf4*-Promotor beschränkt (EE10).

Die spezifische Bedeutung der 3kb *Mrf4*-Promotorsequenz für die selektive Promotoraktivierung des EEEs konnte durch das folgende Konstrukt bestätigt werden. Im Konstrukt EE-10 wurde die Sequenz des -3/-0,5kb *Mrf4*-Bereiches durch eine entsprechend lange heterologe Sequenz des Phagen Lambda ersetzt (Abb. 4.6). Das Transgen wurde in allen untersuchten Embryonen in den jüngsten gebildeten Somiten exprimiert (Abb. 4.6 D-F). Die selektive Promotoraktivierung des EEEs in den Konstrukten APZ-1, EE-1 und EE-2 kann somit auf den -3/-0,5 kb *Mrf4*-Bereich zurückgeführt werden und ist keine Folge von Positionseffekten.

Die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch den EEE (EE-6, Abb. 5.5 und EE-10, Abb. 4.6) zeigte, dass der Enhancer in der Lage ist, den *Mrf4*-Promotor zu aktivieren und dass keine Promotor-Inkompatibilität vorliegt. In den hergestellten Konstrukten konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass Insulatoren zwischen dem *Mrf4*-Promotor und EEE lokalisiert sind, die *in vivo* die Interaktion beider Elemente verhindern könnten und so die Aktivierung auf den *Myf5*-Promotor beschränkt bleibt (EE-2, EE-1). Die Interaktion zwischen dem *Mrf4*-Promotor und EEE wird vielmehr maßgeblich durch den -3/-0,5 kb *Mrf4*-Bereich verhindert. Da dieser Bereich jedoch nicht in der Lage ist, den *Myf5*-Promotor zu blockieren, muss davon ausgegangen werden, dass intrinsische Unterschiede zwischen den *Myf5*- und *Mrf4*-Promotoren existieren müssen (EE-11).

4.1.4 Untersuchungen zur Strukturierung des *Mrf4*-Promotors

Durch die Serie transgener Reporterengenkonstrukte konnte eine 3kb lange *Mrf4*-Promotorsequenz identifiziert werden, welche die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch den EEE verhindert und somit die selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors vermittelt. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die intrinsischen Eigenschaften der beiden Promotoren maßgeblich voneinander unterscheiden und dass die selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den EEE auf einen durch den *Mrf4*-Promotor vermittelten Mechanismus zurückzuführen ist. Daher wurde der molekulare Aufbau des *Mrf4*-Promotors durch Sequenzanalysen und Bestimmung des Transkriptionsstarts näher untersucht und mit dem *Myf5*-Promotor verglichen. Für diesen konnte kürzlich der Aufbau durch die Analyse von 5' terminalen cDNA Enden beschrieben werden (Carvajal et al., 2008). Die Identifikation des Transkriptionsstarts zeigte TATA-Box vermittelte Transkriptionsinitiation.

Der Vergleich der proximalen *Mrf4*-Sequenz unterschiedlicher Mammalia-Spezies durch den BLASTN-Algorithmus der genomischen NCBI-Nukleinsäuredatenbank zeigte zwei signifikant konservierte Regionen innerhalb der -1,3/-1 kb und -0,8/-0,5 kb Regionen (Daten im Anhang). Derartige Konservierung nicht-codierender DNA-Sequenz ist oftmals ein Hinweis auf die Existenz regulatorischer Bereiche im Genom.

Die in dem transgenen Konstrukt EE-6 verwendete 500 bp lange Promotorregion des *Mrf4*-Gens ist mit einem GC-Gehalt von 44% durchschnittlich GC-reich. CpG-Inseln sind in der Promotorregion nicht anzutreffen. In der Sequenz des *Mrf4*-Promotors ließen sich die Konsensussequenzen der Basalelemente TATA-Box (TATAWAAR), BRE^d (RTDKKKK), Initiator (YYANWYY) und DPE (RGWYVT) im näheren Umfeld des Transkriptionsstarts nachweisen (Angabe der Konsensussequenzen nach IUPAC Nukleotid-Code; Gershon et al., 2008; siehe Abb. 4.7). Circa 420 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart konnte zudem ein GAGA-Motiv identifiziert werden, für welches in *Drosophila* ein Zusammenhang zur transkriptionellen Regulation beschrieben wurde (Hendrix et al., 2008). Konsensussequenzen weiterer Basalelemente zeigten keine Übereinstimmungen im *Mrf4*-Promotor. Die TATA-Box liegt in einem Abstand von ca. 80 Nukleotiden weit vor dem beschriebenen Transkriptionsstart, da diese üblicherweise 25–30 bp vom Startpunkt entfernt positioniert ist. In direkter Nachbarschaft zu dieser TATA-Box findet sich die Konsensussequenz eines BRE^d-Elements. Konsensussequenzen für die Initiator- und DPE-Basalelemente fanden sich an mehreren Positionen im *Mrf4*-Promotor, darunter eine auffällige Kombination dieser Elemente, in der die Initiator-Sequenz die Transkriptionsstartstelle flankiert und von einem DPE-Element in dem beschriebenen Abstand gefolgt wird (Gershon et al., 2008). DPE-Elemente agieren in Kooperation mit dem Initiator, wobei der Abstand zwischen den beiden Elementen für die Transkriptionsinitiation essentiell ist.

Vorhersagen zur Funktion dieser Elemente setzt die Kenntnis des exakten Transkriptionsstarts voraus. Die letzte Aktualisierung der annotierten *Mrf4* mRNA-Sequenz erfolgte vor 20 Jahren (Miner et al., 1990), und sollte zunächst durch den Einsatz moderner und sensibler Techniken verifiziert werden. Für die Analyse des terminalen 5´-Transkriptbereiches von *Mrf4* über 5´RACE wurde aus Somiten von Wildtyp-Embryonen Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe eines genspezifischen Primers in cDNA umgeschrieben. Anschließend konnten die 5´Enden der Transkripte durch die SMARTTM Technologie der Firma Stratagene amplifiziert, subkloniert und schließlich sequenziert werden. Die Analysen von 58 individuellen Klonen zeigten verschiedene Startpunkte, die sich über einen Bereich von über 80 Nukleotiden entlang des Promotors erstreckten (Abb. 4.8). Innerhalb dieser Verteilung zeigte sich eine Präferenz für einen Start 19 Nukleotide stromaufwärts des ATG, der in 47% der untersuchten Klone detektiert wurde (Abb. 4.8). Neben diesem dominanten Startpunkt konnten jedoch auch

weitere Klone sequenziert werden, die über diese Stelle hinaus reichten. Derartige Verteilungen mehrerer Transkriptionsstartpunkte sind charakteristisch für sog. disperse Promotoren (Gershon et al., 2008). Die Mehrzahl der Gene in Vertebraten besitzen disperse Promotoren und zeigen verschiedene Startpunkte, die in einem Bereich von 50–100 Nukleotiden verteilt sind. Diese Ergebnisse deuten somit auf einen maßgeblichen Unterschied zu der Transkriptionsinitiation von *Myf5* hin, für die ein definierter Startpunkt 155 bp stromaufwärts des ATGs beschrieben wurde (Carvajal et al., 2008). Um mögliche Artefaktbildung während der cDNA-Synthese durch frühzeitige Termination der Synthese auszuschließen, müssten diese Ergebnisse durch einen RNase Protection Assay bestätigt werden.

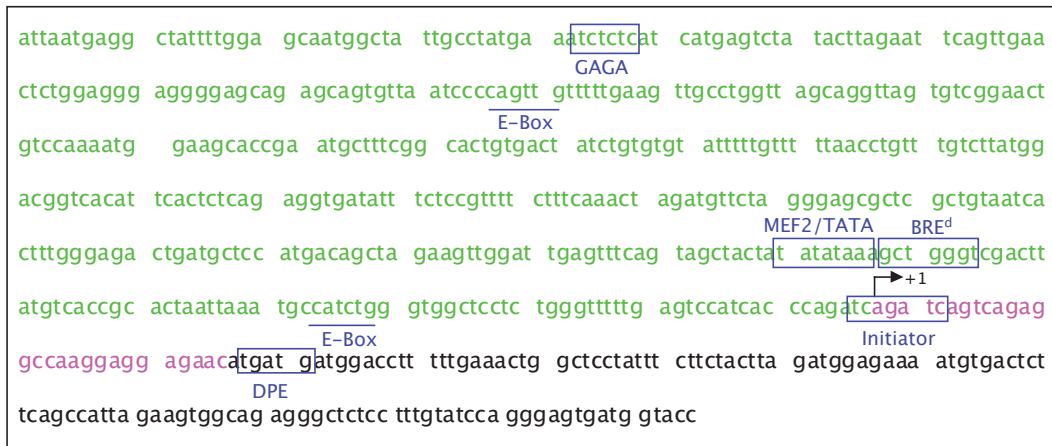


Abb. 4.7: Nukleotidsequenz des *Mrf4*-Minimalpromotors. Die codierende Region des *Mrf4*-Gens ist in schwarzer Schrift dargestellt. Der magentafarbene Bereich zeigt die veröffentlichte Sequenz des 5' untranslatierten Region an, während die Sequenz der Promotorregion in grün dargestellt ist. Potentiell regulative Sequenzen innerhalb dieser Region sind blau markiert.

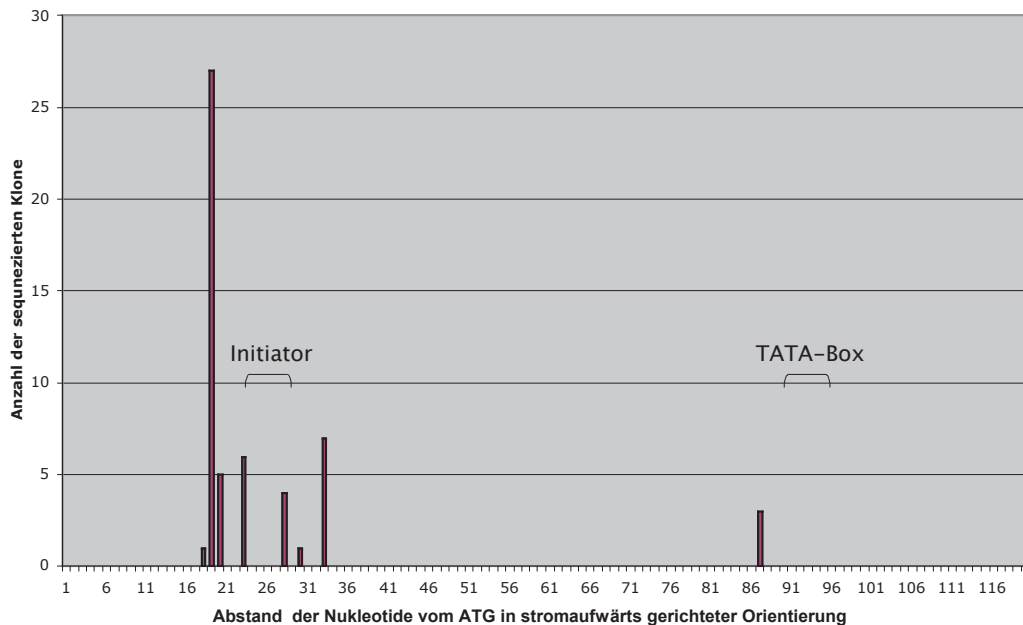


Abb. 4.8: Graphische Darstellung der Ergebnisse der *Mrf4*-Transkriptionsstart Analysen. Die Untersuchungen des 5' Bereiches der *Mrf4*-cDNA zeigen verschiedene Punkte der Transkriptionsinitiation, die über den *Mrf4*-Promotorbereich verteilt sind. Initiator und TATA-Box bezeichnen die relativen Positionen ihrer Konsensussequenzen im *Mrf4*-Promotor. Die Y-Achse des Diagramms stellt die Anzahl der sequenzierten Plasmid-Klone dar. Die X-Achse repräsentiert den Abstand vom ATG in Nukleotiden in stromaufwärts gerichteter Orientierung. Insgesamt wurden 58 verschiedene Klone untersucht.

Die im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen auf eine Beteiligung der 3kb *Mrf4*-Promotorsequenz bei der selektiven Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den EEE hin. Diese Regulation beruht auf einer Abschirmung des *Mrf4*-Promotors, welcher sich durch intrinsische Eigenschaften elementar vom *Myf5*-Promotor unterscheidet. Mit der Identifizierung verschiedener Basalpromotorelemente konnte dieser Unterschied zwischen den beiden Promotoren auf die Ebene der Nukleotidsequenz reduziert werden. Obwohl die Ergebnisse der 5' RACE keinen eindeutigen Transkriptionsstartpunkt, und somit die Initiation durch eines der Basalpromotorsequenzen zeigten, kann die Beteiligung dieser Elemente an der Regulation der Enhancer-Promotor Interaktion nicht ausgeschlossen werden und muss in nachfolgenden Experimenten untersucht werden.

4.2 Die räumliche Organisation des *Mrf4/Myf5*-Genlokus während der Aktivierung durch den –58/–56 kb Enhancer in der Embryonalentwicklung der Maus

Das zweite *Myf5*-spezifische regulatorische Element, welches in meinen Untersuchungen zur selektiven Promotoraktivierung im *Mrf4/Myf5*-Genlokus studiert wurde, war der distale –58/–56 kb Enhancer. Dieser Enhancer reguliert die Aktivierung des *Myf5*-Promotors in Somiten, Extremitäten und im hypoglossalen Strang (Buchberger et al., 2003; Hadchouel et al., 2003). Ab Embryonaltag E10,5 wird *Myf5* in allen Muskelvorläufer-Zellen in den sich entwickelnden Extremitäten exprimiert. Die Aktivierung von *Mrf4* ist zu diesem Zeitpunkt auf myotomale Zellen der Somiten beschränkt und in den Extremitäten nicht zu beobachten (Fomin et al., 2004). Da beide Gene ein überlappendes Expressionsmuster im Myotom aufweisen, ist ein Einfluss des distalen *Myf5*-Enhancers auf den *Mrf4*-Promotor nicht auszuschließen, zumal der stromaufwärts gelegene Enhancer dichter am *Mrf4*- als am *Myf5*-Promotor positioniert ist. Deswegen wurde durch Chromosome Conformation Capturing (3C) die räumliche Organisation des *Mrf4/Myf5*-Genlokus und damit die Interaktion des –58/–56 kb Enhancers mit den beiden Promotoren untersucht. Im Rahmen dieser Experimente konnten durch die Analyse der chromosomalen Organisation wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie die Kommunikation zwischen distalem Enhancer und Promotor vermittelt wird.

Die 3C-Methode wurde ursprünglich für die Untersuchung der Chromosomen-Organisation und deren dynamische Veränderung während meiotischer Prozesse entwickelt (Dekker et al., 2002). Sie ist derzeit neben dem RNA-TRAP (tagging and recovery of associated proteins, Carter et al., 2002) eine der Standardmethoden zur Untersuchung regulativer Elemente und der Bildung von DNA-Schlaufenstrukturen im chromosomalen Kontext von Vertebraten (Tolhuis et al., 2002; Spilianakis et al. 2004; Vernimmen et al., 2007). Durch quantitative Analyse von Crosslinking-Ereignissen zwischen zwei DNA-Restriktions-Fragmenten mittels PCR können Vorhersagen über die Nähe dieser Fragmente innerhalb des Zellkerns getätigt werden.

Für die Herstellung eines 3C-Templates werden durch die Zugabe von Formaldehyd zu den isolierten Zellen des zu untersuchenden Gewebes sowohl Protein-Protein als auch Protein-DNA-Wechselwirkungen stabilisiert, was zur

Quervernetzung von miteinander interagierender DNA-Bereiche führt. Durch Restriktionsverdau der DNA und anschließender intramolekularer Ligation werden zwischen den quervernetzten Restriktionsfragmenten neue Verbindungen gebildet, die durch PCR mit spezifischen Primern detektiert werden können (Abb. 4.9).

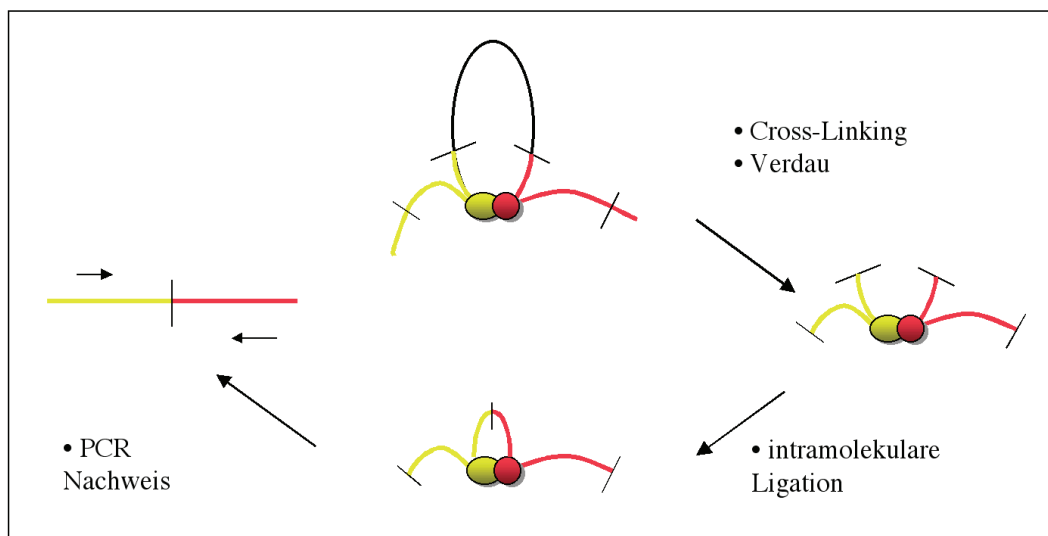


Abb. 4.9: Schematische Übersicht der Arbeitsschritte während der 3C-Untersuchungen. Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer hat die Bildung einer Schlaufenstruktur des dazwischen liegenden genomischen Bereiches zur Folge. Für die Herstellung eines 3C-Templates werden durch Zugabe von Formaldehyd zu den isolierten Zellen die Protein-Protein und Protein-DNA Wechselwirkungen stabilisiert, was zur Quervernetzung von miteinander interagierenden DNA-Bereichen führt. Durch Restriktionsverdau der DNA und anschließender intramolekularer Ligation werden zwischen den quervernetzten Restriktionsfragmenten neue Verbindungen gebildet, die durch PCR mit spezifischen Primern detektiert werden können.

Durch die Anwendung der 3C-Methode im *Mrf4/Myf5*-Genloкус konnte untersucht werden, in wieweit der distale -58/-56 kb Enhancer die Aktivierung des *Myf5*-Promotors über die Distanz realisiert. Des Weiteren konnte eine mögliche direkte Interaktion zwischen dem Enhancer und dem *Mrf4*-Promotor geprüft werden. Die untersuchten Gewebe der Somiten und Extremitäten stellten eine heterogene Zellpopulation dar, in der nur ein Teil der Zellen *Myf5*-positiv waren, weshalb die Bedingungen der Template-Herstellung und der nachfolgenden PCR auf die notwendige Empfindlichkeit hin angepasst werden

mussten. Stichprobenartige Klonierung der PCR-Fragmente und anschließende Sequenzierung bestätigten die Bildung eines 3C-Fragments.

4.2.1 Erhöhung der Sensitivität der 3C-Reaktion für die Anwendung an heterogenem Zellgewebe

Aufgrund der unterrepräsentierten *Myf5*-positiven Zellen in den untersuchten Geweben musste die Sensitivität der 3C-Reaktion durch Modifikation bestehender Protokolle erhöht werden. Die Qualitätskontrolle der hergestellten 3C-Templates erfolgte an mehreren Arbeitsschritten während der DNA-Aufbereitung. Die Isolierung intakter Zellkerne wurde durch DAPI-Anfärbung der Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop bestätigt (siehe Abb. 4.10 A). Die Effizienz des Restriktionsverdaus wurde durch PCR mit zwei Schnittstellen flankierenden Primern an verdauter und unverdauter DNA überprüft (Abb. 4.10 B). In den durchgeführten Tests konnten DNA-Fragmente in der unverdauten DNA amplifiziert werden, während die Amplifikation der verdauten DNA deutlich schwächere bzw. keine Banden im Agarosegel mehr zeigten.

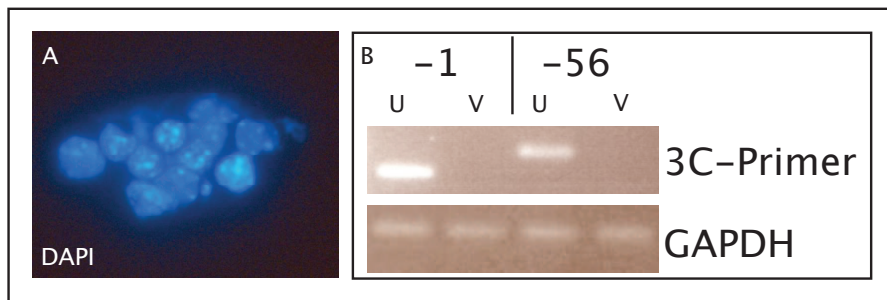


Abb. 4.10: Kontrollen während der Herstellung des 3C-Templates. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DAPI-gefärbten isolierten Nuklei (100fache Vergrößerung; A). Überprüfung der Restriktionsspaltungs-Effizienz erfolgte durch PCR-Amplifikation mit Restriktionsschnittstellen-flankierenden Primern (B). Für die Kontrolle wurden zwei exemplarische Schnittstellen untersucht (im Abstand von 1 kb bzw. 56 kb zum *Myf5*-Promotor). Unverdaute DNA (U) zeigt Amplifikate im Agarosegel, während verdauter DNA (V) deutlichen Rückgang der Amplifikations-Effizienz aufwies (B). Die Normalisierung der Template-Konzentration erfolgte durch die Verwendung von GAPDH-Primern, welche nicht durch Restriktionsspaltung betroffen waren.

Alle verwendeten Primerkombinationen wurden bezüglich ihrer Amplifikations-Effizienz normalisiert, um die erzeugten PCR-Bandenintensitäten im 3C-Test untereinander vergleichen zu können (Daten nicht gezeigt). Für die Herstellung des Kontroll-Templates wurde ein BAC-Klon verwendet, welcher den gesamten *Mrf4/Myf5*-Genlokus umfasste. Dieser wurde mit dem Restriktionsenzym vollständig gespalten und anschließend miteinander ligiert, so dass die entstandenen DNA-Fragmente eine Population aller möglichen Ligationsprodukte repräsentierte. Die verwendeten Primerpaare zeigten dabei vergleichbare Mengen an PCR-Produkt. Primerpaare mit geringen Amplifikationseffizienzen wurden neu entworfen.

Der Verdau der DNA erfolgte durch die Restriktionsendonuklease BspHI, welche den *Myf5*-Genlokus in gleichmäßigen Abständen schneidet. Die schematische Darstellung des *Myf5*-Genlokus in Abbildung 4.11 zeigt die Positionen der beiden Gene *Myf5* und *Mrf4* und des -58/-56 kb Enhancers sowie die Restriktionsschnittstellen der BspHI-Endonuklease und die verwendeten Primer. Der -58/-56 kb Enhancer weist keine internen BspHI-Restriktionsschnittstellen auf, so dass die Interaktion des gesamten Elements durch einen einzigen Primer detektiert werden konnte. Der verwendete konstante Anker-Primer liegt im 5'-Bereich eines Restriktionsfragments, welches das vollständige *Myf5*-Gen enthält. Dieses Restriktionsfragment hat eine Größe von 3491 bp und enthält die Exone 1-3 sowie den gesamten Promotorbereich (Abb. 4.12 B). Das Restriktionsfragment #7 enthält die Sequenz des 2kb-*Myf5* Enhancers einschließlich der konservierten Regionen H1 und H2 (Abb. 4.12 A).

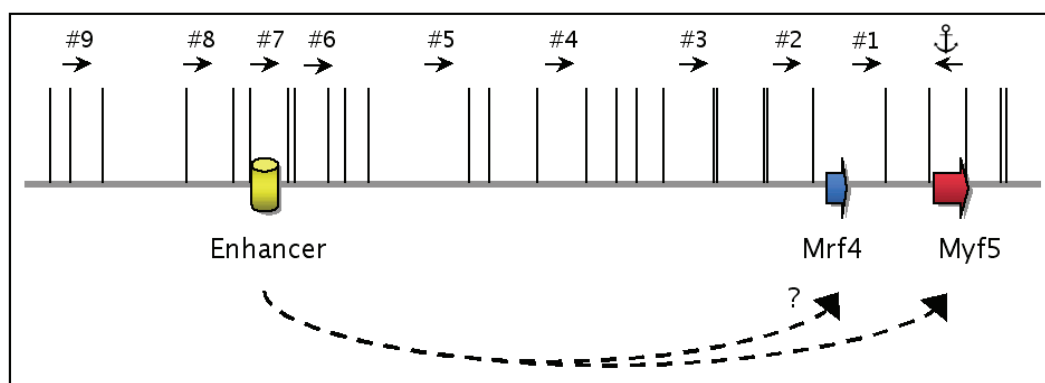


Abb. 4.11: Übersicht der BspHI-Schnittstellen bezogen auf die Gene *Mrf4* und *Myf5* sowie den distalen -58/-56 kb Enhancers. Die vertikalen Striche zeigen die Positionen der Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym BspHI. Die horizontalen Pfeile der

im 3C-Test verwendeten Primer. In diesem Ausschnitt sind die Primer an den Positionen -75 kb (#10) und -140 kb (#11) nicht enthalten.

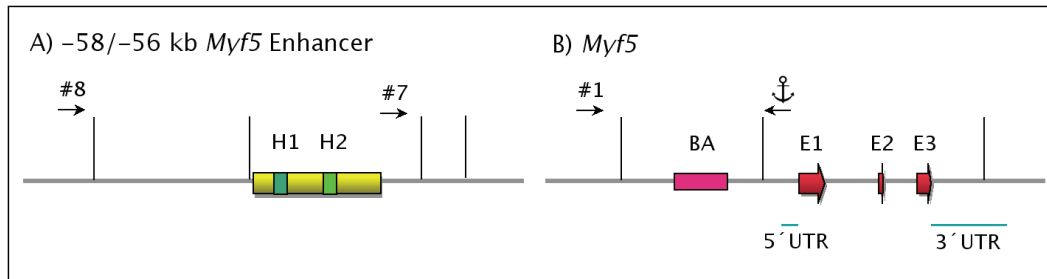


Abb. 4.12: Schematische Detailaufnahme der Lokalisation der verwendeten 3C-Primer für den -58/-56 kb Enhancer und den Myf5 Promotor. Die Positionen und Orientierungen der Primer sind durch Pfeilsymbole angegeben. Die vertikalen Striche zeigen die Positionen der BspHI-Restriktionsschnittstellen an. Abbildung A) zeigt den genomischen Bereich des -58/-56 kb Enhancers (gelb) und die relative Position der konservierten Regionen H1 und H2 (grün). In Abbildung B) ist der Locus des Myf5-Gens mit der Position der exonischen Sequenzen (rote Pfeile) und des Kiemerbögen-Enhancers (magenta) dargestellt.

Der Organisationszustand und die Flexibilität des Chromatins führen zu einem Hintergrundrauschen durch falsch positive Interaktionen, sog. *random collisions*. Diese nicht-spezifischen Interaktionen nehmen mit zunehmendem genomischen Abstand ab (Dekker, 2006). Die Minimierung des Hintergrunds war daher essentiell, um spezifische Interaktion in der untersuchten Region detektieren zu können. Der Level der unspezifischen Hintergrundkollisionen wurde für die untersuchten Templates durch PCR-Amplifikationen mit ansteigender DNA-Konzentration untersucht, wobei jeweils drei unterschiedliche Primerkombinationen verwendet wurden. Das proximale Primerpaar sollte in dieser Kontrolle aufgrund der inhärenten Flexibilität des Chromatins eine häufige Interaktionsfrequenz aufweisen. Des Weiteren wurde eine Primerkombination gewählt, die zwei Fragmente detektieren, die durch einen großen Abstand voneinander getrennt sind und somit eine geringe Hintergrundaktivität zeigten. Das dritte Primerpaar detektierte das Restriktionsfragment des -58/-56 kb Enhancers und diente als Positivkontrolle der 3C-Template Qualität. Anhand dieser verschiedenen Primerkombinationen wurde die Arbeitskonzentration für die qualitative 3C-PCR ermittelt.

Abbildung 4.13 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Titration des 3C-Templates. Es ist zu erkennen, dass in der Kombination mit dem proximalen -4kb Primer bereits mit geringen DNA-Mengen die Amplifikation des 3C-Ereignisses möglich war. Ähnlich starke Signale zeigte die -56kb Primerkombination, die nur eine unwesentlich höhere Menge an DNA benötigte. Der -75kb Primer liegt in einem Restriktionsfragment, für das keine Wechselwirkung mit dem *Myf5*-Promotor vorhergesagt wird und in diesem Ansatz zeigte sich, dass für den Nachweis einer Kollision dieser beiden Fragmente eine 10x höhere DNA-Menge benötigt wurde. Die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion war bei diesem Fragment signifikant geringer, als bei den anderen beiden Primerkombinationen. Für die weitere Durchführung wurde die geringste DNA-Konzentration verwendet, die für eine Amplifikation mit dem -56 kb Primer ausreichend war (Spur 4 in Abb. 4.13).

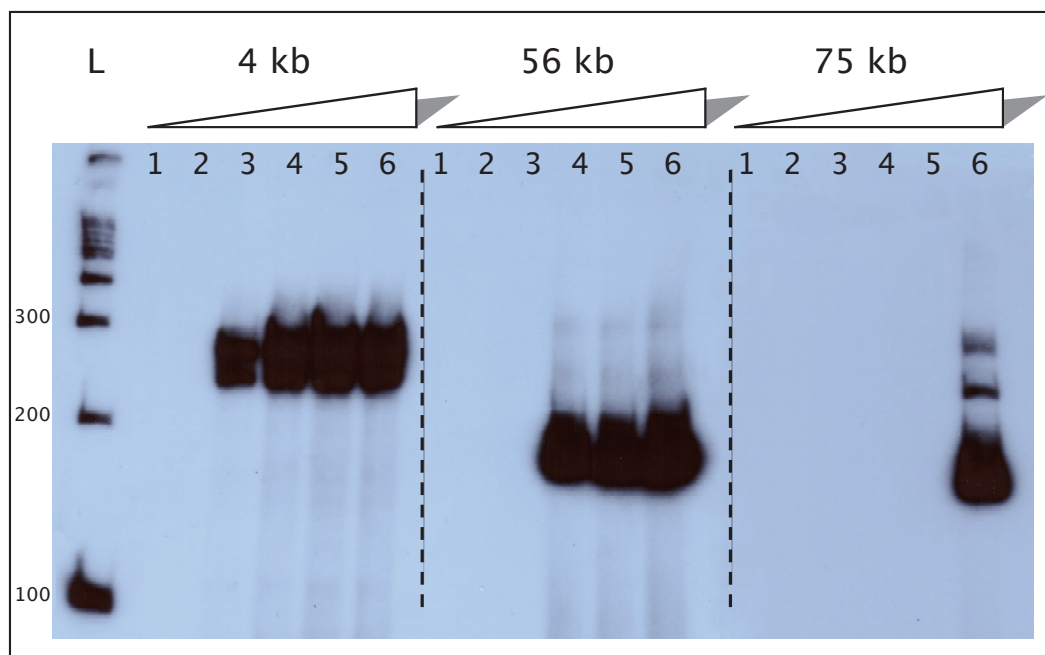


Abb. 4.13: 3C-Template Titration zur Bestimmung der Arbeitskonzentration. Durch 3C-Amplifikation des Templates mit aufsteigender DNA-Konzentration wurde der Level der unspezifischen Hintergrundkollisionen beurteilt. Die Titration wurde mit drei unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt. 1: 0 µl DNA; 2: 0,5 µl DNA; 3: 1 µl DNA; 4: 2 µl DNA; 5: 4 µl DNA; 6: 10 µl DNA; L: 100bp Größenstandard

Die Bestimmung der Arbeitskonzentration erfolgte für jedes präparierte 3C-Template. Es zeigte sich, dass die Menge der einzusetzenden DNA unter den verschiedenen Templates stark variierte. Für die qualitativen 3C-Untersuchungen wurden, in Abhängigkeit der Verdau- und Ligationseffizienz während der Herstellung der Templates, zwischen 30 und 200 ng DNA eingesetzt.

Als zusätzliche Kontrollen zur Qualitätssicherung und Validierung der Ergebnisse wurden 3C-Templates aus Mausgeweben erstellt, in denen die Zellen keiner Formaldehyd-Behandlung unterzogen wurde, bzw. in denen die verdaute DNA ohne den nachfolgenden Ligationsschritt aufgereinigt wurde. In den durchgeführten nested PCRs konnte kein Amplifikationssignal mit 3C-spezifischen Primerkombinationen detektiert werden, wodurch die artifizielle Bildung eines 3C-Fragments während der Template-Herstellung ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Die Kommunikation zwischen -58/-56 kb Enhancer und *Myf5*-Promotor erfolgt über direkte Interaktion beider Elemente

Nach der Validierung der verwendeten Primer konnte die räumliche Konformation des *Myf5*-Gens in Abhängigkeit seines transkriptionellen Status analysiert werden. Die untersuchten 3C-Templates stammten aus Somiten-Gewebe 11 Tage alter Embryonen, sowie aus Extremitätenknospen der Embryonaltage E11,5 und E12,5. Zu diesen Zeitpunkten erfolgt die Aktivierung beider Gene in den Somiten. In den Extremitäten ist *Mrf4* zu diesen Zeitpunkten noch nicht aktiv.

Die Analyse des *Myf5*-Lokus in Zellen der Somiten und Extremitäten zeigte die erwartete Amplifikation promotornaher Primerkombinationen, die mit zunehmendem Abstand abnahmen (Abb. 4.14). Die Detektion dieser zufälligen Kollisionen erfolgte bis zu einem Abstand von 24 kb. Signifikante Amplifikationen zeigte Primerkombination #7, welche das Restriktionsfragment des -58/-56 kb Enhancers detektierte. Diese Interaktion der beiden Elemente konnte sowohl im Somiten-Template, als auch im Extremitäten-Template nachgewiesen werden. Zur Reproduktion der Daten wurden für jedes Template und für jedes untersuchte Alter die PCRs als Duplikate oder Triplikate

durchgeführt. Sequenzierungen der amplifizierten Fragmente bestätigten die Identitäten der 3C-Fragmente (siehe Anhang). Die 3C-Analysen der räumlichen Organisation des *Myf5*-Lokus zeigten eindeutig die Interaktion zwischen dem distalen Enhancer und dem *Myf5*-Promotor in exprimierendem Gewebe.

Die Spezifität dieser Ergebnisse konnte durch Untersuchungen an nicht-*Myf5*-exprimierenden Leberzellen bestätigt werden, in denen keine Amplifikate durch weiter entfernte Primerkombinationen detektiert wurden (Abb. 4.14).

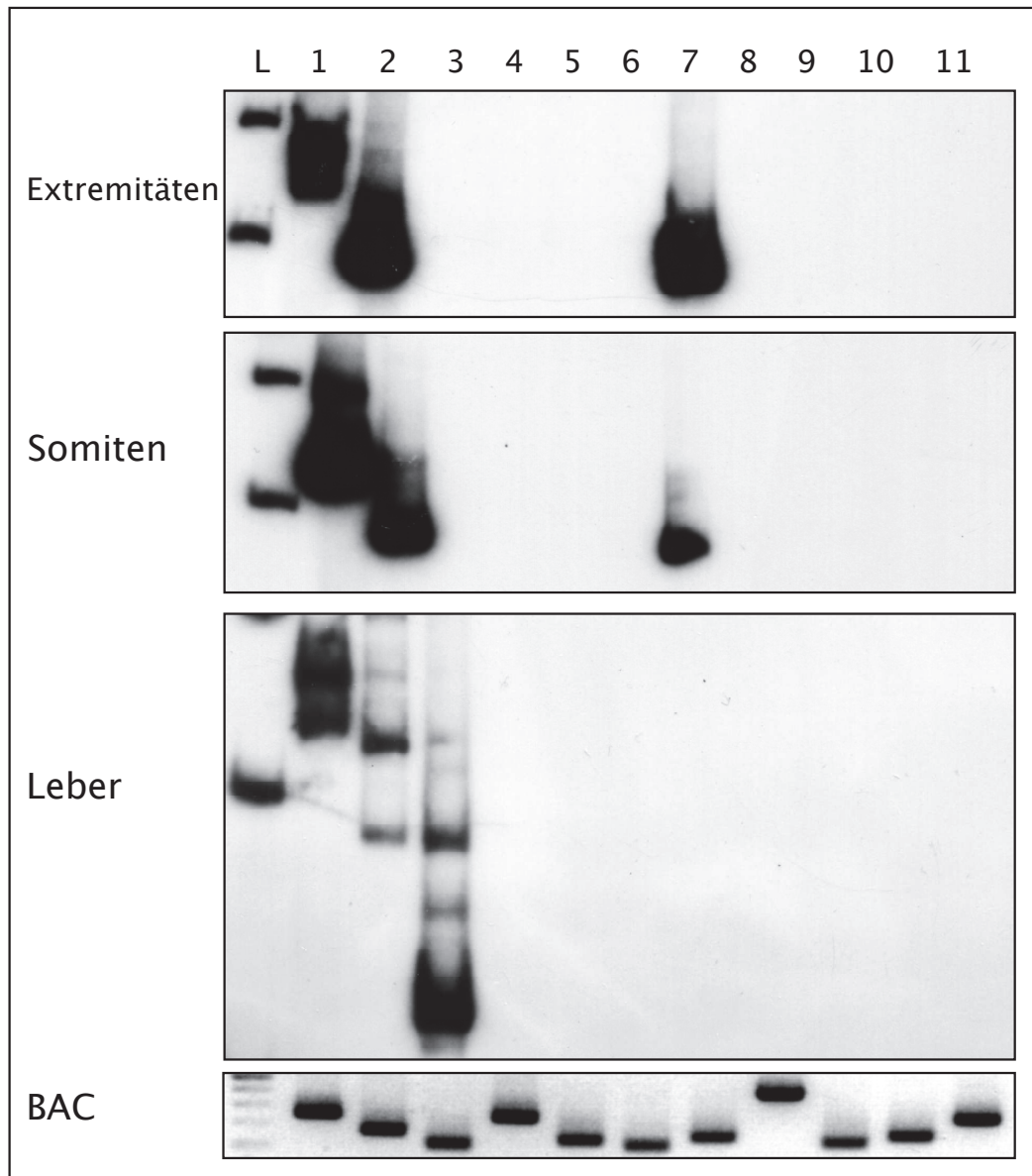


Abb. 4.14: Ergebnisse der untersuchten -58/-56 kb-Enhancer-spezifischen 3C-Ereignisse mit dem *Myf5*-Promotor. Für die qualitative 3C-Analyse des *Myf5*-Genlokus wurden verschiedene Restriktionsfragmente innerhalb des Lokus auf Interaktion mit dem *Myf5*-Promotor untersucht. Die benachbarten Fragmente 1 und 2 zeigen in allen untersuchten Geweben Amplifikate und somit hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion. Diese Wechselwirkung durch zufällige Kollision benachbarter Fragmente konnte in untersuchten Leberzellen ebenfalls für das Fragment #3 gezeigt werden. Mit ansteigender Zunahme der genomischen Distanz nimmt diese Interaktion ab und ließ sich in dem Test nicht mehr nachweisen. Lokales Auftreten einer Interaktion lässt sich mit Primer #7 in Geweben aus Somiten und Extremitätenknospen beobachten, welcher das Restriktionsfragment des -58/-56 kb Enhancers detektiert. Zusätzliche Kontrolle der Primereffizienz wurde an 3C-Template aus den Lokus repräsentierender BAC-DNA

durchgeführt. L: 100bp Größenstandard; 1: 4kb Abstand; 2: 14 kb Abstand; 3: 24 kb Abstand; 4: 34 kb Abstand; 5: 40 kb Abstand; 6: 52 kb Abstand; 7: 56 kb Abstand; 8: 58 kb Abstand; 9: 65 kb Abstand; 10: 75 kb Abstand; 11: 140 kb Abstand

Die Analysen der räumlichen Organisation des *Mrf4*-Lokus wurden ebenfalls in Leber, Somiten und Extremitäten durchgeführt (Abb. 4.15). Für diese Untersuchungen wurden dieselben Templates und Konzentrationen der vorherigen Experimente eingesetzt. Der Anker-Primer wurde durch einen *Mrf4*-spezifischen Primer ersetzt. Die durchgeführten 3C-Experimente zeigten, dass keine Interaktion des *Mrf4*-Promotors mit distalen Elementen erfolgt. Interaktion des -58/-56 kb Enhancers mit dem *Mrf4*-Promotor konnte nicht beobachtet werden, wodurch die Regulation von *Mrf4* durch diesen Enhancer in den Somiten ausgeschlossen werden kann. Die Kurve der semi-quantitativen Analyse der durchgeführten 3C-Experimente stellt einen typischen Verlauf für Chromatin-Regionen dar, die in keiner Schlaufenbildung organisiert sind (Abb. 4.16 B).

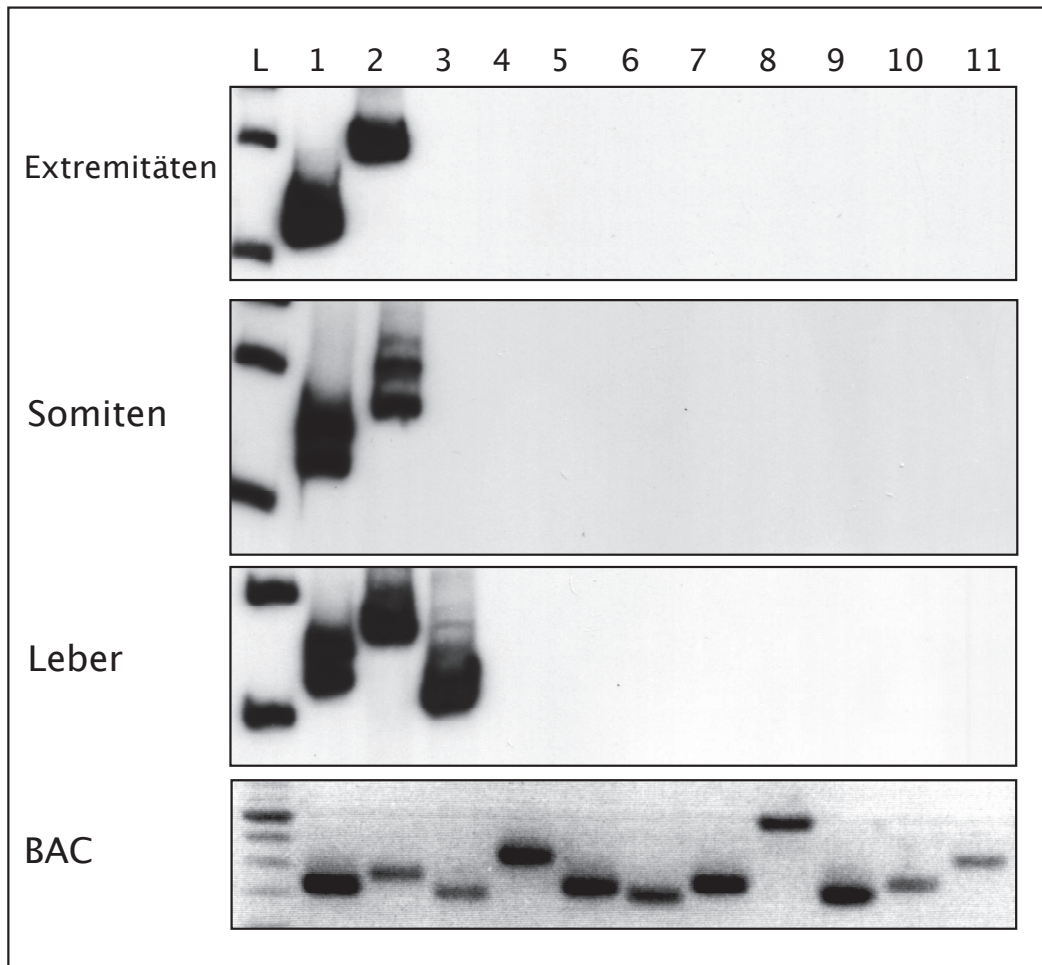


Abb. 4.15: Gelelektrophoretische Auftrennung qualitativer 3C-Untersuchungen zur -58/-56 kb Enhancer-spezifischen Interaktion mit dem *Mrf4*-Promotor. Dargestellt sind untersuchte Gewebe aus Somiten, Extremitäten und Leber sowie die PCR-Kontrollen der Primer-Effizienz an BAC-DNA. Getestet wurden verschiedene Primerkombinationen entlang des *Mrf4*-Genlokus. Das verwendete Anker-Fragment umspannt den Bereich des gesamten *Mrf4*-Gens. Es zeigen sich keine spezifischen Interaktionen des Promotors mit distalen DNA-Sequenzen in den untersuchten Geweben. Positionen der Primer (im relativen Abstand zum *Myf5*-Promotor): 1: 10 kb; 2: 14 kb; 3: 24 kb; 4: 34 kb; 5: 40 kb; 6: 52 kb; 7: 56 kb; 8: 58 kb; 9: 65 kb; 10: 75 kb; 11: 140 kb; L: 100bp Größenstandard

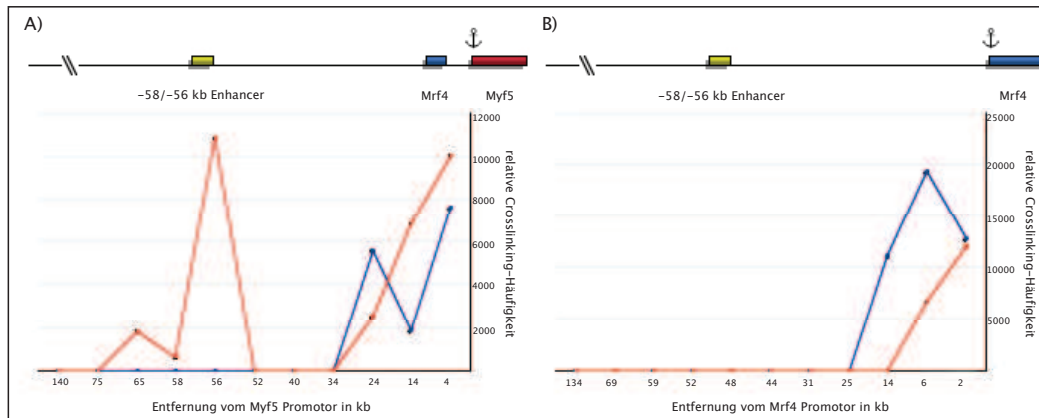


Abb. 4.16: Semi-quantitative Analyse der untersuchten Wechselwirkungen des -58/-56 kb Enhancers mit den Promotoren der Gene *Myf5* (A) und *Mrf4* (B). Die Interaktionshäufigkeiten wurden als Mittelwerte der einzelnen 3C-PCRs berechnet. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. blau: nicht exprimierendes Gewebe (Leber); rot: exprimierendes Gewebe (Extremitäten/Somiten); der gezeigte Anker repräsentiert die Position des feststehenden Primers

Durch die Anwendung der 3C-Methode konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivierung der Genexpression des -58/-56 kb Enhancers durch direkte Interaktion mit dem *Myf5* Promotorbereich erfolgt. Diese physikalische Annäherung muss durch Ausbildung einer Schlaufenstruktur erfolgen, wodurch der dazwischen liegende DNA-Bereich außerhalb des aktiven Transkriptionsapparates gehalten wird. Des Weiteren zeigen die Untersuchungen, dass der distale *Myf5*-Enhancer in dem beobachteten Zeitraum nicht mit dem *Mrf4*-Promotor interagiert. Ein Einfluss des -58/-56 kb Enhancers auf die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors während der Myogenese kann somit für die untersuchten Gewebe und Zeitpunkte ausgeschlossen werden.

4.3 Untersuchungen zur Promotor-Selektivität des *Myf5*-spezifischen -58/-56 kb Enhancers

Durch die durchgeführten 3C-Experimente konnte das selektive Verhalten des distalen -58/-56 kb Enhancers bestätigt werden. Die molekularen Grundlagen dieser spezifischen Interaktion wurden durch funktionelle Analyse einer Serie von Reportergenkonstrukten in transgenen Mäusen untersucht.

Transgene Untersuchungen von Einzelreporterkonstrukten zeigten, dass der isolierte distale Enhancer den *Mrf4*-Promotor aktiviert, wenn er -11,4 kb, -7,4 kb oder -3 kb stromaufwärts des *Mrf4* Gens positioniert wird (Fomin et al. 2004, eigene Daten). Er vermittelt in allen drei Konstrukten ein Muster in Somiten und Extremitäten, das mit dem des *Myf5* Promotors identisch ist (Abb. 4.17). Anders als der epaxiale Enhancer verliert der distale Enhancer damit trotz Anwesenheit der *Mrf4* upstream Region seine Selektivität. Dies lässt vermuten, dass die Regulation der selektiven Promotoraktivierung der beiden Enhancer auf unterschiedlichen Mechanismen beruht.

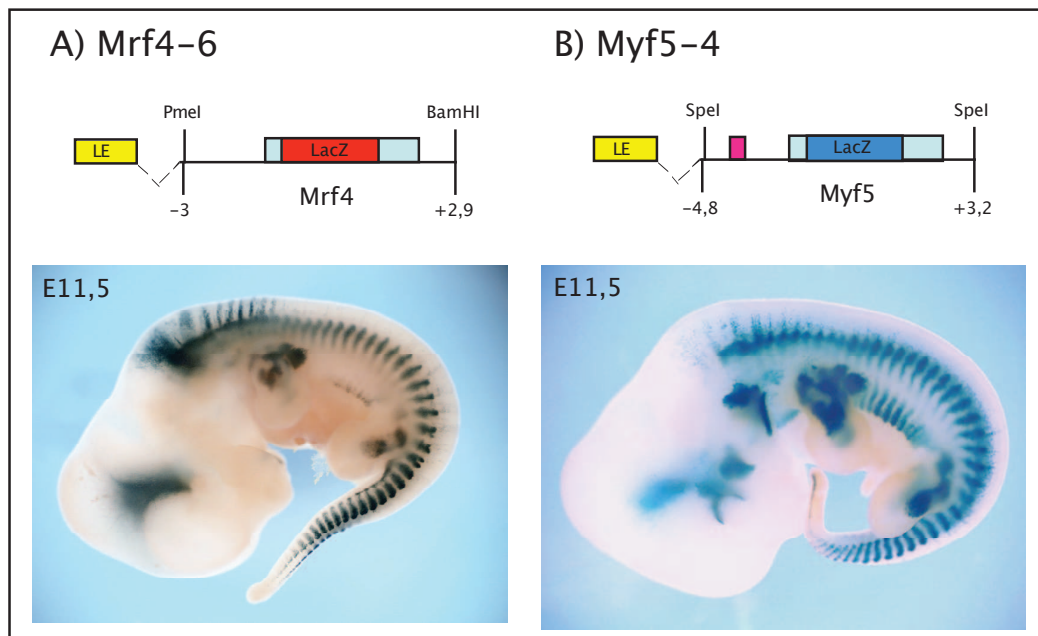


Abb. 4.17: -58/-56 kb Enhancer vermittelte Aktivierung der *Mrf4*- und *Myf5*-Promotoren. Positionierung des isolierten Enhancers vor dem *Mrf4*-Promotor führt zum Verlust der Selektivität. Der Enhancer vermittelt das vollständige Expressionsmuster, dass identisch zu dem des Referenzkonstrukts *Myf5*-4 ist (Buchberger et al., 2003).

4.3.1 Der distale Enhancer zeigt in der Konkurrenz selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors

Die Herstellung des Doppelreporterkonstrukts APZ-2 mit Reportergenen in den Leserastern von *Mrf4* und *Myf5* ermöglichte die Analyse der Aktivität beider Promotoren in einer transgenen Mauslinie. Das Konstrukt basiert auf dem Transgen APZ-1 und umspannt die -7,4 kb *Mrf4* upstream Region, den *Mrf4* Promotor mit AP-Reporter, das *Mrf4* Gen, den gesamten intergenischen Bereich, und den *Myf5* Promotor mit dem LacZ Reportergen. Vor die -7,4 *Mrf4* Region wurde der distale Enhancer kloniert, da er aus dieser Position den *Mrf4* Promotor in Einzelreporterkonstrukten aktivieren konnte (Fomin et al., 2004). Als interne Kontrollelemente der transgenen Expression dienten der myotomale *Mrf4* Enhancer und die *Myf5* Enhancer für die Expression in Kiemenbögen (BA) und frühen Somiten (EEE) (Abb. 4.18).

Die Analysen transgener APZ-2 Embryonen zeigten, dass durch Anwesenheit des zweiten, nativen *Myf5* Promotors die Selektivität des distalen Enhancers zurück gewonnen werden kann (Abb. 4.18). Die für den Enhancer charakteristische Aktivität in den Extremitätenknospen beschränkt sich auf den *Myf5* Promotor (4.18 G, H, L und M) und ist in der *Mrf4*-AP Färbung nicht nachweisbar (B-D, J). Die Aktivierung in den Somiten zwischen E11,5 und 13,5 einschließlich der hypaxialen Ausdehnung (G, H), sowie die Aktivierung in myogenen Zellen der Körperwand blieb auf den *Myf5* Promotor beschränkt. Auch die in der intergenischen Region lokalisierten Enhancer BA und EEE kommunizieren ausschließlich mit ihrem nativen Promotor was durch LacZ positive Zellen in den Kiemenbögen bzw. jungen Somiten veranschaulicht wird (Abb. 4.18 E, F, K). Die Aktivität des *Mrf4* Promotors, die sich zwischen E9,5 und E11,5 Somiten zeigt und am Embryonaltag 12,5 herunterreguliert wird, ist auf die Aktivität des myotomalen Enhancer (Fomin et al., 2004) zurückzuführen (4.18, A-D, I, J).

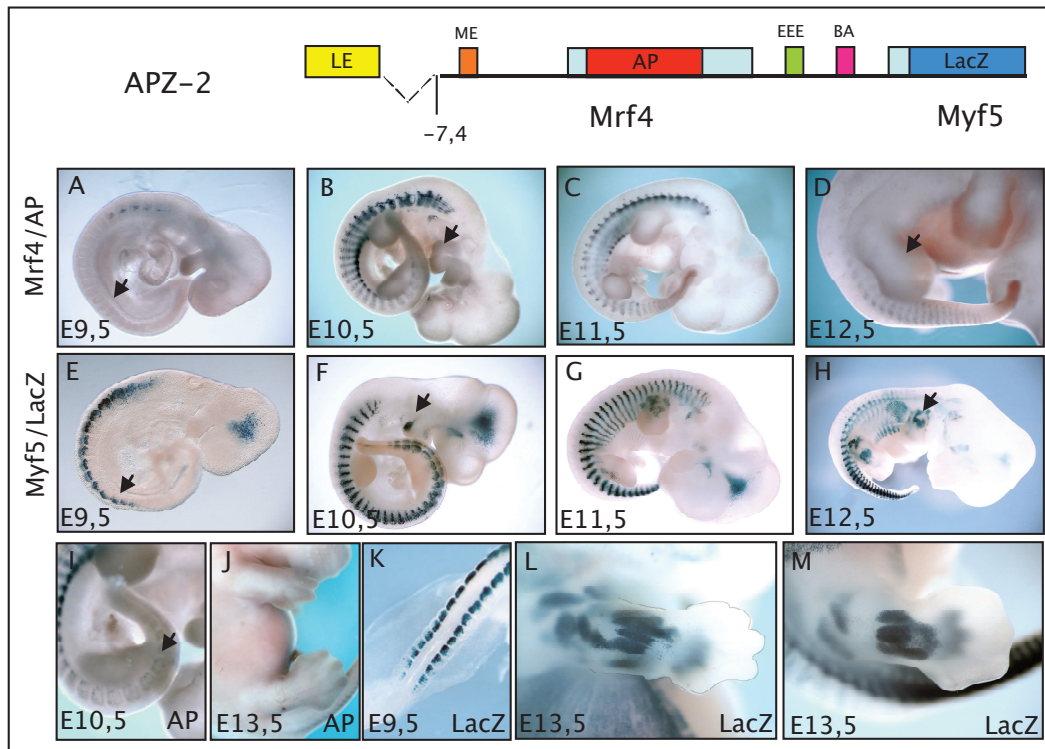


Abb. 4.18: Nachweis der Reportergenaktivität in transgenen APZ-2 Embryonen. Die Verwendung von zwei Reportergenen ermöglicht die zeitgleiche Betrachtung der transgenen Aktivierung von *Mrf4*- (A-D, I und J) und *Myf5*-Promotor (E-H, K-M). LacZ-Färbung zeigt korrektes zeitliches und räumliches Expressionsmuster des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer (LE; Abb. E-H, L und M), Early Epaxial Enhancer (EEE; Pfeil in E) und Kiemenbogen-Enhancer (BA; Pfeil in F). Aktivierung des *Mrf4*-Promotors erfolgt in für den myotomalen Enhancer beschriebenen Domänen (A-D). Aktivierung durch die *Myf5*-Enhancer kann nicht beobachtet werden (Pfeile in A, B und D).

Damit weisen alle Enhancer die Aktivität auf, die der *in vivo* Regulation entspricht. Das Transgen APZ-2 verfügt also über alle notwendigen *cis*-regulatorischen Elemente, die für die spezifische Interaktion mit dem korrespondierenden myogenen Promotor notwendig sind. Da der verwendete Ausschnitt des Genlokus für die selektive Aktivierung durch den distalen Enhancer ausreichend ist, können zudem Sequenzen, die mehr als 11,4 kb stromabwärts des *Mrf4*-Promotors liegen, für die Vermittlung der Selektivität des -58/-56 kb Enhancers ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus haben die Ergebnisse gezeigt, dass der distale *Myf5*-Enhancer in Anwesenheit beider myogenen Promotoren selektiv mit dem *Myf5*-

Promotor interagiert. Dieses Verhalten stimmt mit dem Modell der Promotor Konkurrenz überein, welches den Wettbewerb zweier Promotoren beschreibt (Ohtsuki et al., 1998; Butler and Kadonaga, 2002). Die kompetitive Situation des Doppelreporterkonstrukts ist somit für die nachfolgenden Untersuchungen der selektiven *Myf5*-Promotoraktivierung durch den -58/-56 kb Enhancer essentiell.

4.3.2 Der *Myf5*-Promotor und die intergenische Region sind nicht an der selektiven Promotoraktivierung des distalen Enhancers beteiligt

Die nähere Eingrenzung beteiligter Sequenzen erfolgte durch schrittweise Deletion des Genlokus. Im ersten Schritt wurde der intergenische Bereich von -8,4 kb (300 bp hinter *Mrf4*-ATG) bis -0,3 kb entfernt (APZ-4, Abb. 4.19). Die Deletion der promotornahen Sequenzen betrifft u.a. mögliche Elemente, die eine positive Regulation des *Myf5*-Promotors durch Rekrutierung des distalen Enhancers vermitteln, wie es für Promotor-Tethering beschrieben wurde (Sipos et al., 1998; Calhoun et al., 2002; Calhoun und Levine, 2003; Akbari et al., 2007).

Mit dem Transgen APZ-5 sollte geklärt werden, ob intrinsische Eigenschaften des *Myf5*-Promotors für die beobachtete Promotor Konkurrenz verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde der in APZ-4 verbliebene *Myf5/LacZ*-Minimalpromotor durch den heterologen murinen *heat shock protein (hsp70)/LacZ*-Promotor ausgetauscht (Abb. 4.19). Beide Konstrukte, APZ-4 und APZ-5, enthielten weiterhin den 7,4 kb *Mrf4*-Promotorbereich inklusive myotomalen *Mrf4*-Enhancer als interne Kontrolle.

Histochemischer Nachweis des Transgens zeigte Aktivierung des *Myf5*- (APZ-4) und *HS*-Promotors (APZ-5) in Somiten und Extremitäten (Abb. 4.19 C, D und G, H), die an allen untersuchten Embryonaltagen das Muster des -58/-56 kb Enhancers aufwiesen. Der *Mrf4*-Promotor wurde in beiden Konstrukten nicht von dem distalen Enhancer angesprochen. Die Selektivität des Enhancers blieb somit weiterhin aufrecht erhalten. *Mrf4*-AP positive Zellen ließen sich ausschließlich in Somiten und nicht in den Extremitäten nachweisen (Abb. 4.19 A, B und E, F).

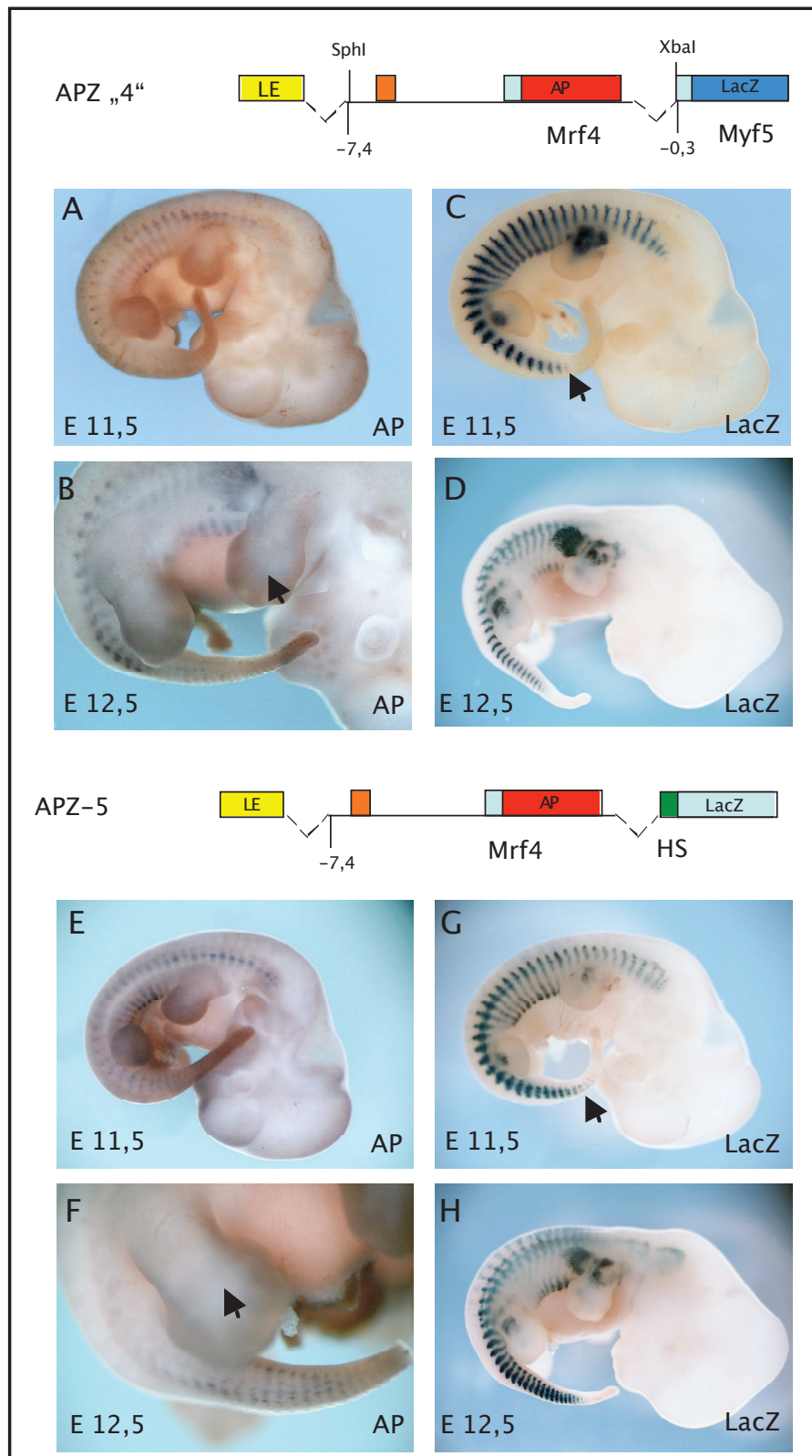


Abb. 4.19: Whole Mount LacZ- und AP-Färbungen transgener APZ-4 (A-D) und APZ-5 (E-H) Embryonen. Deletion des intergenischen Bereiches (APZ-4) und Substitution des

Myf5-Promotors (APZ-5) erhalten die selektive Interaktion des -58/-56 kb Enhancers mit dem *Myf5* Promotor. Die starke Aktivität in Somiten und Extremitäten beschränkt sich auf *Myf5*/LacZ gefärbte Embryonen (C, D, G, H). Durch den Verlust von epaxialem- und BA Enhancer fehlen LacZ-positive Zellen in jungen Somiten und Kiemenbögen (Pfeil in C und G). Die Aktivierung des *Mrf4* Promotors beschränkt sich auf die Domänen des myotomalen Enhancers (A, B und E, F).

Durch diese Ergebnisse kann sowohl die Beteiligung des intergenischen Bereiches als auch des *Myf5*-Promotors selbst an der Vermittlung der selektiven Promotoraktivierung des -58/-56 kb Enhancers ausgeschlossen werden. Dies betrifft sämtliche Mechanismen, die eine Rekrutierung des distalen Enhancers zum Promotor vermitteln, wie es zum Beispiel für das Promotor Tethering beschrieben wurde (Sipos et al., 1998; Calhoun et al., 2002; Calhoun und Levine, 2003; Akbari et al., 2007). Die Ergebnisse zeigten zudem, dass sogar der Austausch des homologen *Myf5*-Promotors durch den *hsp70*-Promotor weiterhin die Selektivität erhielt, wodurch erneut eine Situation der Promotor Konkurrenz geschaffen wurde. Der im endogenen Locus vorliegende Wettbewerb der Promotoren kann durch diesen Versuch jedoch nicht durch intrinsische Eigenschaften des *Myf5*-Promotors erklärt werden, da der verwendete *hsp70*-Promotor einen vom *Myf5*-Promotor abweichenden Aufbau zeigt, bei dem die Transkriptionsinitiation nicht durch eine TATA-Box, sondern über eine GAGA- und GC-Box erfolgt (Bevilacqua et al., 2000; Sequenz des Promotors ist im Anhang angegeben). Es ist zu vermuten, dass die Ursache für die Selektivität des -58/-56 Enhancers auf Eigenschaften des *Mrf4*-Promotors oder der *Mrf4*-proximalen Sequenz beruht.

4.3.3 Deletion der *Mrf4*-proximalen Sequenz hebt die Selektivität des -58/-56 kb Enhancers auf

Da die intergenische Region und der *Myf5*-Promotor keine Elemente enthielten, die Selektivität vermitteln, begrenzte sich deren Lokalisation auf den 7,4 kb Bereich vor dem *Mrf4*-Gen und dessen Promotor. In den beiden darauf folgenden Konstrukten wurde dieser Bereich schrittweise verkürzt (Abb. 4.19). Konstrukt APZ-8 enthält ein 3kb *Mrf4*-Promotorfragment, in APZ-9 wurde ein 0,5 kb *Mrf4*-Promotorfragment verwendet (Abb. 4.19).

Die Analyse transgener APZ-8 Embryonen zeigte ähnliche *Mrf4*-AP und *Myf5*-LacZ Aktivität in Somiten und Extremitäten (Abb. 4.19). Somiten im thorakalen Bereich von 10 und 11 Tage alten Embryonen wiesen zusätzliche ventrale *Mrf4*-AP Expression auf, die für *Myf5*-LacZ nicht zu beobachten war (Abb. 4.19 A und D, G und J, H und K). Deutlich erkennbar sind zudem AP-positive Zellen in den sich entwickelnden Extremitäten ab Embryonaltag E11,5 und in den Muskelzellen der Körperwand von 13 Tage alten Embryonen (Abb. 4.19). Der Vergleich von AP- und LacZ-Muster verdeutlicht fehlende Aktivierung des *Mrf4*-AP Reporters in den vorderen Extremitäten und der Schulterregion (Abb. 4.19 I und L).

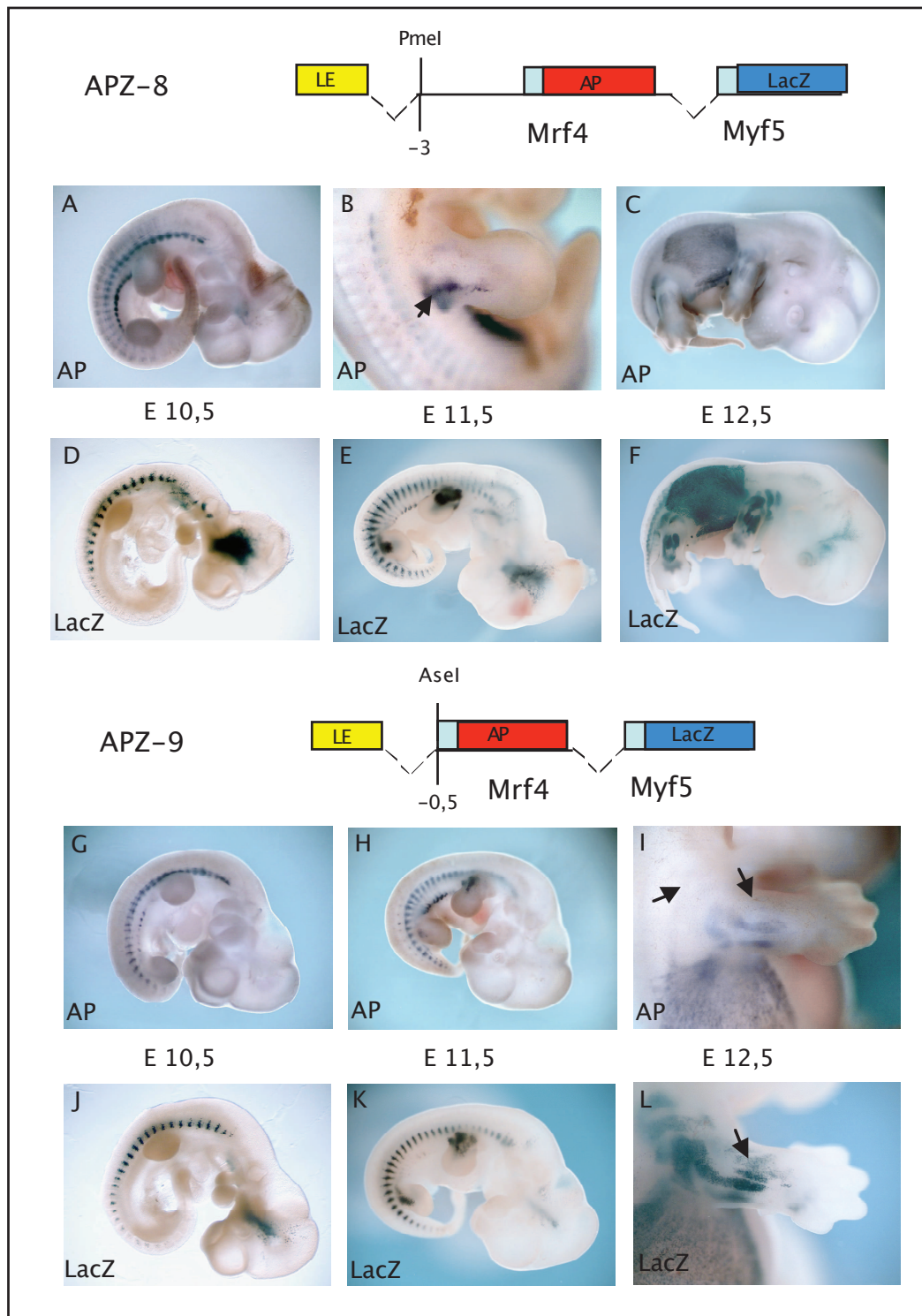


Abb. 4.19: Histochemischer Nachweis transgener Aktivität von APZ-8 und APZ-9 Embryonen. Deletion der *Mrf4*-upstream Regionen -7,4/-3 kb (A-F) und -7,4/-0,3 kb (G-L) führt zum Verlust der selektiven Promotoraktivierung. AP-positive Zellen sind in Somiten, Extremitäten und in Muskelzellen der Körperwand zu erkennen. In Bereichen der

vorderen Extremitäten zeigt der *Mrf4*-Promotor ein unvollständiges Expressionsmuster (Pfeile in I und L).

Durch die Deletion des -7,4/-0,5 kb *Mrf4*-Promotorbereiches konnte die selektive Promotoraktivierung des -58/-56 kb Enhancers aus den vorherigen Konstrukten nicht mehr rekapituliert werden. Da beide Deletionen ein identisches Muster der *Mrf4*-AP Expression zur Folge haben, muss der Bereich, der für die Vermittlung der Promotorspezifität in den Konstrukten APZ-2, APZ-4 und APZ-5 zuständig ist, innerhalb der -7,4/-3 kb Abschnitts lokalisiert sein.

Eine mögliche allgemeine Fähigkeit zur Regulation der transkriptionellen Aktivierung dieses Sequenzabschnitts sollte durch ein Doppelreporterkonstrukt überprüft werden, dass zwei heterologe Promotoren enthielt (Abb. 4.20). Das Rückgrat dieses Konstrukts bestand aus dem distalen Enhancer, dem Promotor des *Thymidin Kinase* Gens (TK, Herpes Simplex Virus) in Fusion mit dem AP-Reporter und dem *HS*-Promotor LacZ Fragment (APZ-7, Abb. 4.20). Die Analyse dieses Transgens APZ-7 in Mäusen zeigte, dass der distale Enhancer die beiden heterologen Promotoren gleichermaßen aktiviert. AP und LacZ gefärbte Embryonen zwischen Embryonaltag 11 und 13 wiesen ein nahezu identisches Muster in Somiten und Extremitäten auf. (Abb. 4.20 A-F).

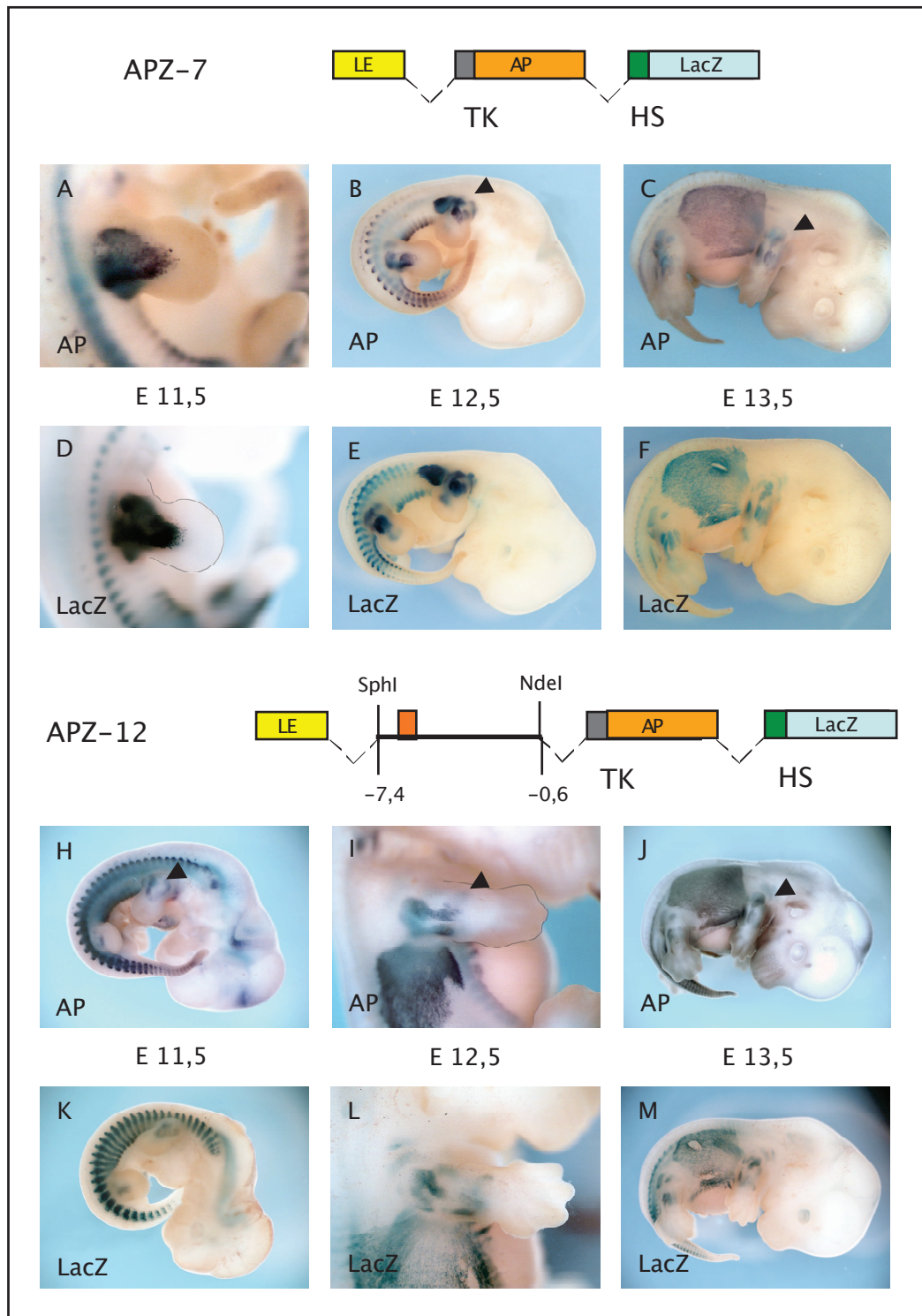


Abb. 4.20: AP- und LacZ-Färbungen transgener APZ-7 und APZ-12 Embryonen. Der Bereich von *Mrf4* -7,4 kb bis -0,5 kb besitzt keine allgemeine Fähigkeit der Enhancer-Blockierung. Der -58/-56 kb Enhancer aktiviert die beiden heterologen Promotoren gleichermaßen (H-M) und zeigt keinen Unterschied zu dem APZ-7 Referenz Konstrukt (A-F).

Zur Analyse der regulierenden Eigenschaft des -7,4/-0,5 Bereichs, wurde die Sequenz zwischen dem distalen Enhancer und dem *TK*-Promotor von APZ-7 kloniert (APZ-12, Abb. 4.24). Eine abschirmende Wirkung dieser Sequenz sollte sich im Verlust der *TK*-AP Aktivierung deutlich machen. Die transgenen APZ-12 Analysen zeigten jedoch, dass die Sequenz keine allgemein blockierenden Eigenschaften aufweist, da AP- und LacZ gefärbte Embryonen gleiche Muster aufweisen (Abb. 4.24 H-M), dass dem der APZ-7 Embryonen entspricht. Für die Vermittlung von Enhancer-Promotor Selektivität ist dieses Element somit auf spezifische Eigenschaften des *Mrf4*-Promotors angewiesen.

Der hier beobachtete Mechanismus lässt sich keiner bisher beschriebenen Regulation zuordnen und würde eine neue Möglichkeit beschreiben, wie in komplexen genetischen Loci Promotor Enhancer Spezifität vermittelt werden kann.

5 Diskussion

In eukaryontischen Genomen sind funktionell verwandte Gene oftmals in demselben genetischen Lokus angeordnet. Diese, wahrscheinlich durch Duplikation von Genen entstandenen Loci, zeichnen sich durch den gemeinsamen Gebrauch von Enhancern des ursprünglichen Gens aber auch durch Entstehung individueller Enhancer für das neu entstandene Gen aus (Bruce et al. 2001; Locascio et al. 2002; de Souza et al. 2005; Innan and Kondrashov, 2010). Für die Kontrolle der Genexpression können diese Enhancer zum Teil sehr weit von ihrem jeweiligen Zielpromotor entfernt liegen. Die physikalische Verbindung von zwei oder mehreren Genen mit unterschiedlichen Expressionsmustern in demselben Lokus führt demnach zu dem Problem der unspezifischen Aktivierung von Promotoren durch benachbarte Enhancer, weshalb Mechanismen etabliert werden mussten, die eine korrekte Aktivierung des responsiven Promotors in komplexen Genloci sicherstellen. Diese Mechanismen können in zwei grundsätzliche Kategorien unterteilt werden. In der Ersten agiert der Enhancer durch die exklusive Kombination von Protein-Bindungsstellen im Enhancer und Promotor ausschließlich mit dem Zielpromotor. Für die zweite Möglichkeit wird die Selektivität der Enhancer durch zusätzliche *cis*-regulatorische Elemente wie z.B. Insulatoren oder Tethering Elemente realisiert, die falsche Interaktionen blockieren bzw. die Rekrutierung zum Zielpromotor fördern (Übersicht in Miele and Dekker, 2008). Erst die Steuerung dieser spezifischen Aktivierung erlaubt die korrekte zeit- und gewebespezifische Expression der Gene während der Embryonalentwicklung.

Der in dieser Arbeit untersuchte Genlokus der myogenen Faktoren *Mrf4* und *Myf5* zeichnet sich durch komplexe Regulation der einzelnen Gene über eine Vielzahl regulativer Sequenzen aus. Diese Elemente erstrecken sich über einen 140 kb großen Bereich und steuern die transkriptionelle Aktivierung in den verschiedenen anatomischen Bereichen und Zeitpunkten der Embryonalentwicklung (Patapoutian et al., 1993; Zweigerdt et al., 1997; Hadchouel et al., 2000; Summerbell et al., 2000; Buchberger et al., 2003; Carvajal et al., 2003; Fomin et al., 2004; Zammit et al., 2004). Während dieser Aktivierung muss nicht nur gewährleistet werden, dass die Enhancer über die sehr weiten Distanzen ihre Funktion ausüben können, sondern vielmehr auch, dass diese Aktivierung ausschließlich am dafür vorgesehenen Zielpromotor erfolgt. Viele der *Myf5*-spezifischen Enhancer liegen näher am *Mrf4*-Promotor als

am *Myf5*-Promotor oder sind in intronischen Sequenzen des benachbarten *Ptprq*-Gens lokalisiert, wodurch die Existenz von regulatorischen Mechanismen für die selektive Promotoraktivierung zwingend postuliert werden muss.

Dieser komplexe Aufbau des *Mrf4/Myf5*-Genlokus und die hochspezifische Aktivierung der beiden Gene führten zu der in dieser Arbeit untersuchten Fragestellung nach der Organisation und Realisation der selektiven Promotoraktivierung durch dessen Enhancer. Durch intensive Arbeiten der letzten Jahre konnte die Organisation des Genlokus untersucht und aufgeklärt werden (Zweigerdt et al., 1997; Hadchouel et al., 2000; Summerbell et al., 2000; Carvajal et al., 2001; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2002, 2003; Hadchouel et al., 2003; Buchberger et al., 2003, 2007; Chang et al., 2004; Fomin et al., 2004). Dennoch ist bis heute nur wenig über die Mechanismen der selektiven Promotoraktivierung in diesem Genlokus bekannt. Mit den von Carvajal et al. (2008) beschriebenen *Transcriptional Balancing Sequences* (TRABS) konnte ein neuer Mechanismus beschrieben werden, der einen Teil der Regulation der *Mrf4*- und *Myf5*-Expression übernimmt, wodurch die Genauigkeit der Promotoraktivierung in diesem komplexen Genlokus unterstützt wird (Carvajal et al., 2008). TRABS übernehmen als kryptische Promotoren eine Rolle im Management zur Aufrechterhaltung eines transkriptionellen Gleichgewichtszustandes im *Myf5*-Genlokus. In diesem Gleichgewichtszustand können unterschiedliche Enhancer-Elemente und der *Myf5*-Promotor verschiedene kurzlebige Konformationen aus produktiven und nicht-produktiven Zuständen einnehmen, wobei die TRABS die Bevorzugung der produktiven Konformation begünstigen und somit die Interaktion mit dem *Mrf4*-Promotor verhindert wird.

Um die weiterhin offene Fragestellung der spezifischen selektiven Promotoraktivierung im *Mrf4/Myf5*-Genlokus näher zu untersuchen, wurden die *Myf5*-spezifischen Enhancer der frühen epaxialen Expression und des -58/-56 kb Enhancers, deren Regulation in früheren Arbeiten detailliert beschrieben wurde, ausgewählt (Summerbell et al., 2000; Gustafsson et al., 2002; Teboul et al., 2002, 2003; Buchberger et al., 2003, 2007; Hadchouel et al., 2003; Bajard et al., 2006; Borello et al., 2007). Durch die Generierung transgener Reporter-Konstrukte konnten für beide Enhancer *cis*-regulatorische Sequenzen identifiziert werden, welche die Selektivität der Promotoraktivierung herbeiführten. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnten belegen, dass die Mechanismen der selektiven Aktivierung nicht durch

den responsiven *Myf5*-Promotor realisiert werden, sondern vielmehr durch blockierende Elemente hervorgerufen werden, die den nicht-responsiven *Mrf4*-Promotor vor den Einflüssen der umgebenden Enhancer abschirmen.

5.1 Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer resultiert in der Bildung von Chromatin-Schlaufen und direkter Interaktion beider Elemente

Der distale -58/-56 kb Enhancer reguliert die Aktivierung des *Myf5*-Promotors in den Somiten zwischen Embryonaltag E9,5 und E13,5 sowie in den Extremitäten ab Embryonaltag E10,5 (Buchberger et al., 2003; Hadchouel et al., 2003). Die Expression von *Mrf4* ist während dieser Zeit auf myotomale Zellen der Somiten beschränkt (Bober et al., 1991; Fomin et al., 2004). Durch die Methode des Chromosome Conformation Capture konnte die Frage beantwortet werden, wie der distale Enhancer seinen Einfluss auf den *Myf5*-Promotor über eine derart weite Distanz koordiniert. Des Weiteren konnte untersucht werden, ob der *Mrf4*-Promotor ebenfalls durch den distalen *Myf5*-Enhancer aktiviert wird, da ein Einfluss des Enhancers durch die zeitweise überlappende Expression beider Gene im Myotom nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Für die Untersuchungen an der Kommunikation zwischen distalen -58/-56 kb Enhancer und den Promotoren des *Mrf4/Myf5* Genlokus durch die 3C-Methode wurde ein ca.75 kb großer Ausschnitt des Genlokus in exprimierenden Zellen der Somiten sowie in nicht-exprimierenden Leberzellen ausgewählt. Die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass während der Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den distalen Enhancer beide Elemente in direkter Nachbarschaft zueinander positioniert sind. Eine derartige Konstellation konnte in den Leberzellen nicht beobachtet werden. Des Weiteren konnte durch diese Methode erstmals direkt nachgewiesen werden, dass der *Mrf4* Promotor während der embryonalen myotomalen Aktivierung nicht durch den -58/-56 kb Enhancer beeinflusst wird. Die beobachtete Konstellation der genomischen Fragmente muss die Bildung einer Schlaufenstruktur zur Folge haben, wodurch der konkurrierende *Mrf4*-Promotor womöglich in einem Bereich außerhalb des aktiven Transkriptionsapparates gehalten wird (Kadauke and Blobel, 2009).

Obwohl die 3C-Technologie eine leistungsstarke Methode zur Determinierung der räumlichen Organisation mit einer hohen Auflösung des untersuchten Lokus darstellt, setzen biologische und technische Rahmenbedingungen die Grenzen. Die Detektion quervernetzter Interaktionen zwischen *cis*-regulatorischen Elementen repräsentiert den augenblicklichen Zustand der Zelle zum Zeitpunkt der Präparation. Daher stellen die Ergebnisse solcher Analysen immer Momentaufnahmen dar und sind nicht dazu geeignet, mögliche kurzfristige Ereignisse zu detektieren. Ein grundsätzliches Problem während der Etablierung dieser Technik stellte die inhomogene Zellpopulation *Myf5*- (bzw. *Mrf4*) positiver und -negativer Zellen in den Somiten dar. Die erschwerte Detektion der Interaktionshäufigkeiten musste durch Erhöhung der Sensitivität über Verwendung radioaktiv-markierter Primer in der nested-PCR ausgeglichen werden, weshalb exakte quantitative Analyse der Amplifikate nicht möglich war und zudem den Nachweis unspezifischer Interaktionen erhöhte. Sowohl die sorgfältigen Standardisierungen der Reaktionsbedingungen als auch die durchgeführten Kontrollen gewährleisteten jedoch die notwendige Sensitivität und Reproduzierbarkeit zur qualitativen Detektion der 3C-Ereignisse (Dekker, 2006).

Obwohl die Analysen der räumlichen Organisation des *Mrf4/Myf5*-Genlokus neue Erkenntnisse zur transkriptionellen Regulation brachten, bleiben weiterhin viele Schlüsselfragen zur Regulation des *Myf5*-Gens offen. Die Wahl des Restriktionsenzym und die daraus resultierende Auflösung des genomischen Bereiches mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von ca. 2,9 kb, erlauben keine Vorhersagen über beteiligte Bindungsmotive. Durch Verwendung eines weiteren Restriktionsenzym, das mit einer höheren Frequenz schneidet, sowie einer verringerten Stringenz während der Fixierung der Zellen, könnte u. U. eine höhere Auflösung erreicht werden. Für die Identifikation neuer regulativer Elemente im *Myf5*-Genlokus muss zudem die Quantifizierung der PCR-Produkte durch Anwendung der real-time PCR verbessert werden (El Hassan et al., 2009). Die Visualisierung der Chromatin-Schlaufenstruktur durch RNA-FISH (fluorescent in situ hybridization) würde die Ergebnisse der durchgeführten 3C-Analysen in einem unabhängigen Ansatz bestätigen (Ronshaugen and Levine, 2004).

Das für diesen Genlokus gezeigte Ereignis der Interaktion zweier genomischer Bereich über weite Distanzen hinweg, führt zu der Frage der

Mechanismen, die eine solche Interaktion vermitteln können. Verschiedene Untersuchungen unterstützen die vorherrschende Hypothese, dass Promotoraktivierung durch distale Steuerelemente mit der Ausbildung von Chromatin-Schlaufen einhergeht (Tolhuis et al., 2002; Spilianakis and Flavell, 2004; Liu and Garrard, 2005; Fraser, 2006; Li et al., 2006; Vernimmen et al., 2007; Jing et al., 2008; Kadauke and Blobel, 2009; Nolis et al., 2009). Dabei wird vermutet, dass am Enhancer gebundene Proteine direkt mit Promotor-assoziierten Faktoren interagieren und somit die dazwischen liegende DNA aus dem aktiven Promotorbereich ausgeschlossen wird (Tolhuis et al., 2002; Jing et al., 2008). Ein weiteres Modell beschreibt die Migration des Enhancer-Komplexes entlang des Chromatins, bis dieser auf einen funktionellen Promotor trifft (Hatzis et al., 2002; Wang et al., 2005). In beiden Fällen wird der Aufbau des Präinitiationskomplexes durch die direkte Nachbarschaft von Enhancer und Promotor begünstigt und führt in der Folge zur transkriptionellen Aktivierung des Gens.

Für den intensiv untersuchten Lokus der *β-Globin* Gene konnten erstmals Interaktionen über weite Distanzen hinweg durch die Anwendung von RNA-TRAP und Chromosome Conformation Capture nachgewiesen werden (Carter et al., 2002; Tolhuis et al., 2002). Zusätzliche Beispiele für derartige Interaktionen wurden in einer Vielzahl weiterer Loci beobachtet (Übersicht in Kadauke and Blobel, 2009), darunter das Gencluster der *β-Globin* Gene (Vernimmen et al., 2007), *HoxB1* (Wurtele et al., 2006) und die Gencluster *Dlx5*, *Dlx6* und *H19-Igf2*, die dem genomischen Imprinting unterliegen (Murell et al., 2004; Horike et al., 2005; Kurukuti et al., 2006; Yoon et al., 2007). Zusammenfassend betrachtet zeigen diese Ergebnisse, dass die Bildung von Chromatin-Schlaufen als eine generelle Eigenschaft der Chromatin-Organisation in Eukaryoten angesehen werden kann und diese an diversen Aufgaben wie Aktivierung und Reprimierung der Transkription sowie DNA Rekombination beteiligt sind.

Obwohl für die Bildung stabiler Chromatin-Schlaufen bereits die Beteiligung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, Strukturproteine und genereller Transkriptionsfaktoren in sog. Transkriptionsfabriken beschrieben werden konnte, bleiben die molekularen Grundlagen dieser Schlaufenbildung bis heute unverstanden (Marenduzzo et al., 2007). So offenbarten Reporterkonstrukte und *in vitro* Transkriptionstests die Beteiligung und Förderung der Schlaufenbildung durch den *Drosophila* GAGA-Faktor (Mahmoudi

et al., 2002; Petrascheck et al., 2005). Bindungsstellen für diesen Faktor ließen sich sowohl in den Globin Promotoren als auch in der *locus control region* (LCR) nachweisen, wodurch die Bildung der Schlaufenstruktur durch Homodimerisierung des Faktors denkbar wäre. In Vertebraten konnten die Transkriptionsfaktoren *BRG1*, *EKLF* und *GATA-1* im α - und β -Globin Locus sowie *SATB1* im *TH2 Zytokin*-Lokus identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei Positionierung der distalen Elemente am responsiven Promotor spielen (Drissen et al., 2004; Vakoc et al., 2005; Cai et al., 2006, Kim et al., 2009).

Durch die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse konnte erstmalig die transkriptionelle Aktivierung von *Myf5* durch distale Elemente auf molekularer Ebene untersucht werden. Neben dem Nachweis der direkten Interaktion dieser beiden Elemente konnte zudem die durch transgene Untersuchungen aufgestellte Hypothese der selektiven Promotoraktivierung durch den -58/-56 kb Enhancer bestätigt werden. Die Frage nach der Vermittlung dieser Selektivität wurde durch die Herstellung verschiedener Reportergenkonstrukte und die Analyse der transgenen Embryonen untersucht.

5.2 Die selektive Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer erfolgt durch Blockierung des *Mrf4*-Promotors

Untersuchungen mit transgenen Einzelreporterkonstrukten zeigten die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer (Fomin et al., 2007). Die Herstellung von Doppelreporterkonstrukten mit *Mrf4*/AP- und *Myf5*/LacZ-Reportern in dieser Arbeit erlaubte die gleichzeitige Betrachtung beider myogener Gene zu verschiedenen Zeitpunkten der Mausentwicklung. Durch diesen Ansatz konnte gezeigt werden, dass der *Mrf4*-Promotor nicht mehr durch den -58/-56 kb Enhancer aktiviert wird, sobald er in Konkurrenz mit dem *Myf5*-Promotor steht (APZ-2), weshalb in dem beobachteten Bereich die Regulation durch einen Insulator ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren konnte sowohl die Deletion des intergenischen Bereiches (APZ-4) als auch die Substitution des *Myf5*-Promotors durch einen heterologen Promotor (APZ-5) die beobachtete Konkurrenz der beiden Promotoren nicht aufheben. Durch diese

Ergebnisse kann der *Mrf4/Myf5*-Genloкус eindeutig von weiteren komplexen Genloкi, wie z.B. dem *Drosophila bithorax*-Komplex unterschieden werden. Dieser Lokus enthält die drei homeotischen Gene, *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* und *Abdominal-B (Abd-B)*, welche für die Identität der posterioren thorakalen und abdominalen Segmente zuständig sind (Lewis E.B., 1978). Die transkriptionelle Regulation von *Abd-B* wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus Enhancern, Silencern, Insulatoren, Promotor Targeting Sequenzen (PTS) und Promotor Tethering Elemente (PTE) realisiert (Akbari et al., 2006, 2008; Maeda and Karch, 2006;). Die Enhancer in den sog. infraabdominalen regulatorischen Domänen (iab) werden durch Insulatoren voneinander abgegrenzt und durch PTS bzw. PTE-Elemente, welche in direkter Nachbarschaft zum *Abd-B* Promotor lokalisiert sind, zum Zielpromotor geführt (Akbari et al., 2008). Die Existenz derartiger Elemente konnte für die Regulation des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer nicht gezeigt werden, da die Deletionen dieser Bereiche die selektive Promotoraktivierung im Transgen aufrecht erhielten (APZ-4, APZ-5). Darüber hinaus konnte die von Carvajal et al. (2008) postulierte Beteiligung von Transcriptional Balancing Sequences (TRABS) an der selektiven *Myf5*-Promotoraktivierung durch meine Daten ebenfalls nicht bestätigt werden. Die von Carvajal et al. durchgeführten Deletionen des *Myf5*-Promotors (B195APZ^{ΔMP5}) und des proximalen Kiemenbögen-Enhancers (B195APZ^{ΔPAE/MP5}) aus den transgenen BAC-Konstrukten resultierten in Veränderungen im Expressionsmuster des *Mrf4*-Reporters, die zur Aktivierung in *Myf5*-spezifischen Domänen führten. Die Beeinflussung des *Myf5*-Lokus führte in beiden untersuchten Transgenen zu einer *Mrf4*-Aktivierung in den Vorder- und Hinterextremitäten, sowie in hyoiden und mandibularen Kiemenbögen und im Gehirn. Einen solchen Einfluss des intergenischen Bereiches und des *Myf5*-Promotors konnte ich in meinem experimentellen Kontext nicht beobachten. Die Deletionen dieser Bereiche in den Konstrukten APZ-4 und APZ-5 führten nicht zur Aktivierung des *Mrf4-AP* Reportergens in den Zellen der Extremitätenknospen. Eine Beteiligung dieses Bereiches des *Myf5*-Genloкус bei der Realisierung der Selektivität des -58/-56 kb Enhancer kann in meinem experimentellem Ansatz ausgeschlossen werden und muss deshalb auch in der *in vivo* Situation erneut diskutiert werden.

Weitere Deletionen stromaufwärts des *Mrf4*-Promotors führten schließlich zum Verlust der Selektivität des -58/-56 kb Enhancers und der Aktivierung des *Mrf4*-Promotors in den transgenen Embryonen (APZ-8 und APZ-9). Die selektive

Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer wird somit über eine Abschirmung des *Mrf4*-Promotors durch ein stromaufwärts gelegenes Element realisiert, wodurch der Enhancer zum *Myf5*-Promotor weiter geleitet wird. Ein möglicher aktivierender Einfluss des Elements auf den zweiten Promotor muss ausgeschlossen werden, da die selektive Promotoraktivierung durch den distalen Enhancer erhalten bleibt, wenn der *Myf5*-Promotor ausgetauscht wird (APZ-5), nicht aber, wenn der *Mrf4*-Promotor ausgetauscht wird (APZ-12). Für die Realisierung der selektiven Promotoraktivierung ist dieses Element somit nicht auf den *Myf5*-Promotor sondern vielmehr auf den *Mrf4*-Promotor angewiesen. Diese beobachtete Blockierung durch das 7,4 kb *Mrf4*-Promotorfragment kann von den bekannten Insulatoren unterschieden werden, da sowohl die Notwendigkeit der Promotor-Kompetition als auch die fehlende Fähigkeit zur Blockierung weiterer, heterologer Promotoren signifikante Unterschiede zur Insulator-Definition darstellen (West et al., 2002; West and Fraser, 2005; Gaszner and Felsenfeld, 2006). Die derzeit am besten charakterisierten Insulatoren lassen sich in *Drosophila* finden. Bislang wurden mit den *scs*- und *scs'*-Sequenzen des *hsp70*-Lokus (Kellum et al., 1992; Zhao et al., 1995), dem *gypsy*-Insulator des *gypsy*-Retrotransposons (Spana et al., 1988), dem Fab8 Insulator aus dem *Bithorax*-Komplex und dem SF1 Insulator im *Antennapedia*-Komplex (Belozerov et al., 2003) fünf unterschiedliche Insulator-Typen beschrieben. Jeder dieser Insulatoren besteht aus einer spezifischen DNA-Sequenz und einem DNA-Bindungsprotein, welches mit der Sequenz interagiert (Gurudatta and Corces, 2009). In den *Drosophila* Insulator-Komplexen konnten Proteine identifiziert werden, welche in allen Typen vorkommen und für einen allgemein gültigen Mechanismus sprechen (Mohan et al., 2007; Gerasimova et al., 2007; Bartkuhn et al., 2009; Bushey et al., 2009). In Vertebraten wurden bislang mit dem CTCF-Insulator und dem SINE B2 Element zwei unterschiedliche Insulator-Typen in einer Vielzahl verschiedener Genloki beschrieben (Lunyak et al., 2007; Wallace and Felsenfeld, 2007).

Die spezifische Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer lässt sich durch keines der bekannten Modelle eindeutig erklären und stellt daher eine neue Variante der selektiven Promotoraktivierung dar. Eine erste Eingrenzung potentiell regulativer Sequenzen innerhalb des an der Selektion beteiligten proximalen *Mrf4*-Bereiches erfolgte durch Sequenzanalyse mit verschiedenen Vertebraten Genomen durch den BLAST-Algorithmus der genomischen NCBI-Nukleinsäuredatenbank (Daten im Anhang). Dabei konnten

drei Bereiche (-6,5/-6,2 kb, -5,2/-5,0 und -3,7/-3,5 kb) im Maus-Genom identifiziert werden, die mit Übereinstimmungen von 75%-96% signifikant konservierte Bereiche mit verschiedenen Mammalia Genomen teilen. Da funktionell irrelevante DNA-Bereiche durch Ansammlungen zufälliger Mutationen im Verlauf der Evolution zunehmend ihre Homologie zu anderen Spezies verlieren, ist die Anwesenheit derart hoch konservierter Regionen in nicht-transkribierten Bereichen ein starker Hinweis auf regulatorische Eigenschaften dieser Sequenzen. Der Bereich von -6,5 bis -6,2 liegt innerhalb des myotomalen Enhancers und wurde bereits in den Untersuchungen von Marina Fomin (Fomin et al., 2004) als Bereiche mit auffällig hohen Homologien erwähnt.

Obwohl die molekularen Mechanismen dieser Regulation nicht endgültig geklärt werden konnten, kann aus den gewonnenen Daten gefolgert werden, dass es, im Kontext der transgenen Untersuchungen, zu einer Beeinflussung bzw. Blockierung des *Mrf4*-Promotors kommt, so lange sich der Promotor in einem inaktiven Zustand befindet (siehe Abb. 5.1 A). Deshalb scheint es möglich, dass der proximale Bereich über die Bindung eines speziellen, bisher noch nicht bekannten Faktors „X“ die Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren und somit die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors verhindert. Durch diese Tarnung des *Mrf4*-Promotors können die Informationen der benachbarten Enhancer ungehindert den *Myf5*-Promotor erreichen. Die selektive Blockierung des *Mrf4*-Promotors wird zum entsprechenden Zeitpunkt durch Rekrutierung endogener Transkriptionsfaktoren z.B. über den myotomalen Enhancer aufgelöst, woraufhin die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors im Myotom erfolgt (Abb. 5.1 B). Ob diese These allerdings *in vivo* tatsächlich zutrifft, muss in weiterführenden Studien geprüft werden.

Des Weiteren muss ebenfalls geklärt werden, warum die beobachtete Blockierung des *Mrf4*-Promotors einer kompetitiven Situation bedarf, da in Abwesenheit eines zweiten Promotors die Blockierung des *Mrf4*-Promotors nicht ausreichend war und die Aktivierung des Transgens erfolgte (Mrf4-6, Fomin et al., 2007). Dem Modell der Promotor-Kompetition zufolge beeinflussen inhärente Eigenschaften von Promotoren und Enhancer die Interaktion bestimmter Kombinationen während andere Kombinationen nur ineffizient verlaufen. Infolgedessen kann ein Enhancer verschiedene Promotoren aktivieren, selektiert jedoch eine einzelne Promotor-Region. Durch die Aktivierung des bevorzugten Gens wird die Expression benachbarter Gene ausgeschlossen. Fällt diese Konkurrenz der Promotoren weg, so aktiviert der distale -58/-56 kb Enhancer

wieder den *Mrf4*-Promotor. Die beobachtete Selektion durch den proximalen Bereich des *Mrf4*-Gens ist somit klar von den bekannten Insulatoren abzugrenzen und scheint vielmehr eine Rolle bei der Vermittlung der Affinität des *Mrf4*-Promotors zum -58/-56 kb Enhancer zu spielen.

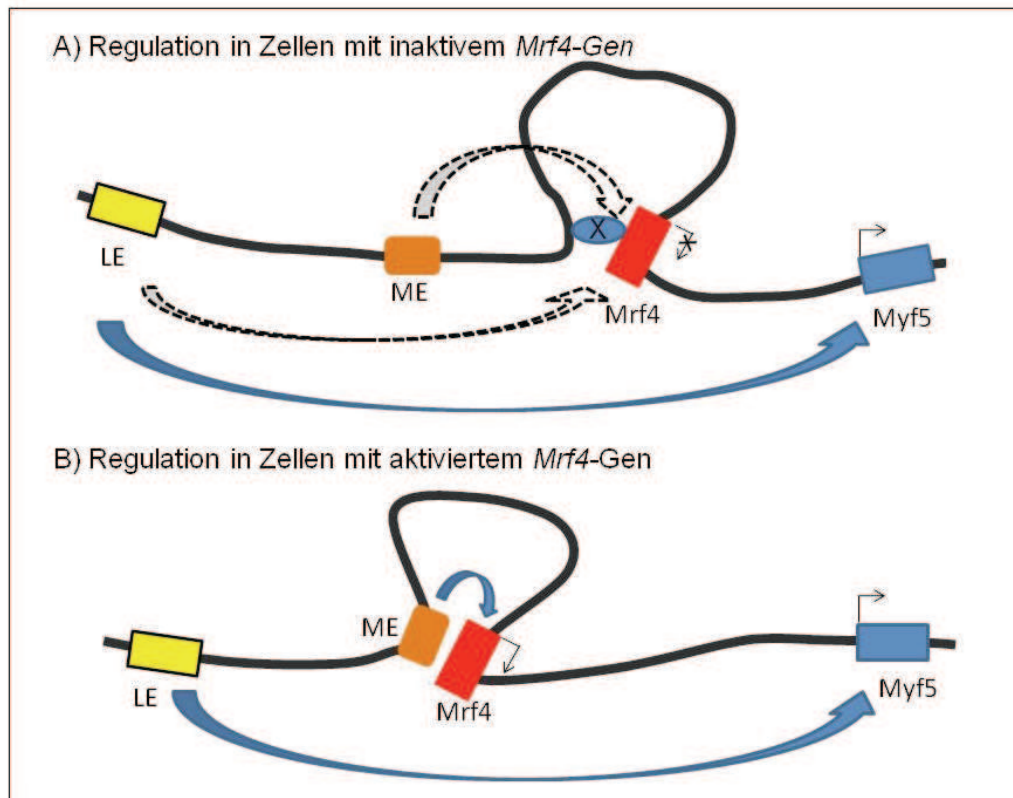


Abb. 5.1: Hypothetisches Modell zur Beeinflussung des *Mrf4*-Promotors und der selektiven Aktivierung des *Myf5*-Promotors durch den -58/-56 kb Enhancer. Interaktion des *Mrf4*-Promotors mit dem -7,4/-3 kb upstream Bereich durch den Faktor „X“ führt zur Isolierung des Promotors und verhindert Interaktion mit benachbarten Enhancern (Abb. A). Dieses Abschirmen wird bis zu der *Mrf4*-Aktivierung in den myotomalen Zellen durch die Rekrutierung endogener Transkriptionsfaktoren aufrechterhalten (Abb. B). In beiden Situationen verhindert die Blockierung des Promotors die Interaktion mit weiteren Enhancern, wie z.B. dem -58/-56 kb *Myf5*-Enhancer.

5.3 Die selektive Promotoraktivierung des frühen epaxialen Enhancers wird durch inhibierende Effekte im *Mrf4*-Promotor erzielt

Die transgenen Untersuchungen des EEEs erfolgten durch aufeinander aufbauende Deletionen des initialen Konstrukts APZ-1. Dieses Konstrukt, welches 16 kb stromaufwärts, inklusive *Mrf4*-Gen, des *Myf5*-Promotors enthält, zeigte frühe epaxiale Expression des *Myf5*-Promotors und war in der Lage, das endogene selektive Verhalten des Enhancers vollständig zu rekapitulieren. Während der Analyse der folgenden Konstrukte zeigte sich, dass sowohl der *Myf5*-Promotor als auch der gesamte intergenische Bereich keinen Einfluss auf das selektive Verhalten des EEEs ausübten. Da innerhalb dieses Bereiches auch die von Carvajal et al. (2008) beschriebenen TRAPS liegen, muss die Beteiligung dieser Elemente an der Selektivität des EEEs ausgeschlossen werden. Die aufgestellte Hypothese, dass durch Deletion der TRAPS aus dem *Myf5*-Lokus das transkriptionelle Gleichgewicht und somit die Selektivität des Enhancers aufgehoben werden könnte (Carvajal et al., 2008), kann durch meine Ergebnisse eindeutig widerlegt werden. Vielmehr weisen die Daten auf eine Regulierung der selektiven Promotoraktivierung des EEE durch die 3kb *Mrf4*-Promotorregion hin, indem die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors verhindert wird. Die identifizierte *Mrf4*-Promotorsequenz kann jedoch ebenfalls klar von den bekannten Insulatoren unterschieden werden, da sie weder in der geforderten Position zwischen Enhancer und Promotor lokalisiert ist, noch die Fähigkeit zur allgemeinen Abschirmung von Enhancer-Effekten besitzt, was durch die Resultate der transgenen Untersuchungen (EE-1 und EE-2) gezeigt wurde.

Sequenzanalysen der 3kb *Mrf4*-Promotorregion konnte ebenfalls die Anwesenheit konservierter Regionen belegen (Daten im Anhang). Innerhalb des untersuchten Promotorfragments zeigten zwei Bereiche signifikant hohe Homologien (-0,5/-0,8 kb und -1,0/-1,3 kb) zu den verglichenen *Mrf4*-Regionen verschiedener Mammalia-Spezies. Der hohe Grad der Konservierung der Nukleotidsequenz lässt auch in diesem Fall auf eine funktionelle Rolle dieser Region schließen. Die tatsächliche Beteiligung der Homologie-Regionen an der selektiven Promotor-Aktivierung im *Mrf4*/*Myf5*-Genloкус muss durch weitere nachfolgende funktionelle Deletions-Analysen überprüft werden.

Da die Untersuchungen der hergestellten transgenen Mäuse auf intrinsische Unterschiede der Promotoren von *Myf5* und *Mrf4* hinwiesen, wurde die Transkriptionsinitiation am *Mrf4*-Promotor durch 5' RACE betrachtet. Zwar konnte der *Mrf4*-Promotor durch Anwesenheit verschiedener Basalpromotor-Elemente (TATA-Box, Initiator, DPE-Element, BRE^d und GAGA-Motiv) auf molekularer Ebene klar vom *Myf5*-Promotor, welcher durch eine TATA-Box reguliert wird (Carvajal et al., 2008), unterschieden werden, jedoch konnte durch die gezeigte verteilte Ansammlung der Transkriptionsstartpunkte keine Korrelation zu eines dieser Basalpromotor-Elemente gefolgert werden. Die 5' RACE Daten zeigten zudem eine sehr kurze Sequenz der 5' untranslatierten Region (5' UTR), weshalb die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass es bei der Herstellung der cDNA zu methodisch bedingten Artefakten gekommen sein kann. Obwohl die Experimente in mehreren unabhängig durchgeführten Ansätzen durchgeführt wurden, könnten ungünstige Sekundärstrukturen im 5' Bereich der *Mrf4*-mRNA zu verfrühten Abbrüchen der Polymerase-Reaktion und somit zu artifiziellen Produkten führen. Zwar gibt es keine strenge Korrelation zwischen der Länge der 5' UTR und der Effizienz der Translationsinitiation, dennoch führt eine stark verkürzte Leadersequenz zu reduzierter Translationseffizienz (Kozak, 1991). Für eine effiziente Translationsinitiation ist eine Distanz von mindestens 25 Nukleotiden zwischen der „Cap“-Struktur und dem Initiator AUG (Startcodon) notwendig. Bei einem zu geringen Abstand zwischen der „Cap“-Struktur und dem Startcodon kann das Ribosom das AUG nicht mehr erkennen (Yoon and Donahue, 1992).

Der unterschiedliche Aufbau der Promotoren, welcher durch die Zusammenstellung der Basalpromotorelemente und Promotor-proximaler Sequenzen gegeben ist, kann zu einer Selektivität und präferentiellen Aktivierung durch Enhancer führen (Butler and Kadonaga, 2001; Juven-Gershon et al., 2008). Der in *Drosophila* identifizierte Mechanismus des Promotor-Stallings (Gilmour et al., 1986), der auch als „Polymerase-Pausing“ bekannt ist, bedient sich solcher spezifischen Basalpromotorelemente und weist interessante Parallelen zu der beobachteten Regulation des frühen epaxialen Enhancers auf. Dieser Mechanismus könnte zum jetzigen Zeitpunkt die selektive Promotoraktivierung des EEEs im *Mrf4/Myf5*-Genloкус erklären (Abb. 5.2). Lange Zeit galten pausierende Polymerasen als eine Ausnahmeerscheinung einiger weniger induzierbarer Gene, aber moderne genomweite Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich beim Promotor Stalling um ein allgemeines Phänomen bei

einer Vielzahl von Genen handelt (Muse et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007; Hendrix et al., 2008). Das Promotor-Stalling, das mittlerweile auch bei verschiedenen Mammalia-Genen beobachtet wurde (Aida et al., 2006; Saunders et al., 2006; Guenther et al., 2007; Core et al., 2009; Nechaev and Adelman, 2008), beschreibt eine Enhancer-unabhängige Polymerase-Rekrutierung am Promotor (Übersicht in Wu and Snyder, 2008). Die Elongation der Transkription wird jedoch nach 25–50 Nukleotiden durch den Einfluss von negativen Transkriptionsfaktoren gestoppt und die Polymerase wird bis zu ihrer endgültigen Freigabe durch entwicklungs- oder umweltspezifische Signalmoleküle in diesem Zustand arretiert (Lis et al., 1998; Gilmour, 2009). Mit den Transkriptionsfaktoren DSIF (DRB sensitivity-inducing factor) und NELF (negative elongation factor) konnten erste Schlüsselmoleküle dieser Regulation identifiziert werden (Yamaguchi et al., 2002; Wu et al., 2003; Cheng and Price, 2007; Muse et al., 2007; Gilmour, 2009). DSIF ist sowohl an der Induktion der PolII-Pausierung als auch an der späteren Synthese des Transkripts beteiligt (Price, 2008). Die unterschiedliche DSIF-Aktivität wird durch die Rekrutierung der P-TEFb Kinase (positive transcription elongation factor b), welche gleichzeitig die C-terminale Domäne von DSIF und große Untereinheit der PolII phosphoryliert, gesteuert (Price, 2008). Pausierte PolII konnte für viele Promotoren von entwicklungsspezifischen Genen nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass sich der Organismus durch die Rekrutierung und Arretierung von PolII auf die Entwicklungsprozesse vorbereitet und somit die präzise Expression der Gene steuern kann (Nechaev and Adelman, 2008; Boettiger and Levine, 2009). In vielen *Drosophila*-Promotoren wurden Kombinationen verschiedener Basalpromotor-Elemente, wie GAGA, Initiator und DPE, sowie ein neues Sequenzmotiv, der sog. „Pause Button“ (PB) beobachtet, für die eine Rolle während der Polymerase-Arretierung angenommen wird (Hendrix et al., 2008). Obwohl die reine Existenz dieser Sequenzmotive im Promotor keinen Beweis für Promotor-Stalling darstellen kann, so erfüllt der *Mrf4*-Promotor mit den DPE und Insulator-Motiven zumindest die Voraussetzung für eine solche Regulation. Die für *Drosophila* postulierte Sequenz des PB (KCGRWCG) zeigte keine Übereinstimmungen zu dem *Mrf4*-Bereich +1 bis +50. Jedoch weist dieser Bereich des *Mrf4*-Gens mehrere ähnliche Sequenzen (KCCRWGG bzw. KGGRWCC) auf, die unter Umständen Vertebraten-Variationen des *Drosophila* PBs darstellen.

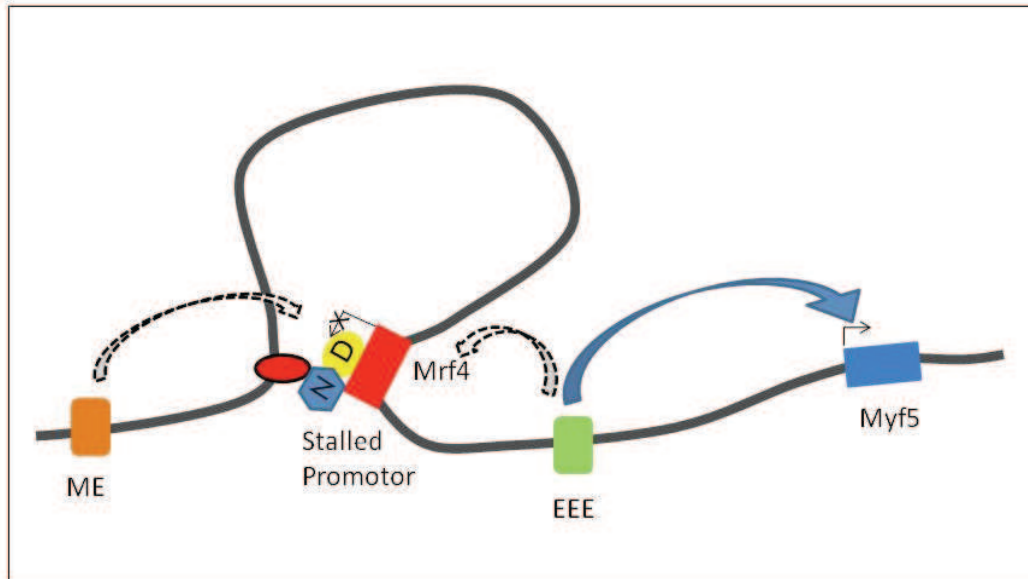


Abb. 5.2: Regulation der selektiven Promotoraktivierung für den frühen epaxialen Enhancers. Die Beeinflussung des *Mrf4*-Promotors (rot) durch den proximalen 3kb-Bereich führt zur Blockierung der Promotoraktivierung durch den EEE (grün). Die Ursache für diese Blockierung könnte durch Arretierung der PolIII durch die negativen Elongationsfaktoren NELF (N) und DSIF (D) am *Mrf4*-Promotor erklärt werden, wobei der 3kb-Promotorbereich stabilisierende Auswirkungen ausüben würde. Die Blockade wird durch Rekrutierung endogener Transkriptionsfaktoren durch den myotomalen Enhancer (ME, orange) in den Zellen des Myotoms unterbrochen.

Die 3kb *Mrf4*-Promotorregion, für welche die Beteiligung an der selektiven Promotoraktivierung gezeigt wurde, kann stabilisierende Effekte auf die Arretierung der Pol II ausüben. Die Beteiligung zusätzlicher Sequenzen am Promotor Stalling konnte bereits für den murinen β -Globin Genloкус gezeigt werden, in welchem die Locus Control Region (LCR) an der Regulation der Genexpression und an der Aktivierung der arretierten Polymerase aktiv beteiligt ist (Sawado et al., 2003; Miele and Dekker, 2008). Die LCR besteht aus fünf DNaseI hypersensitiven Sequenzen, die stromaufwärts des Lokus positioniert sind, und führt regulatorischen Funktionen aus, indem sie die Chromatin-Organisation des Genlokus modifiziert und die Expression einzelner Globin Gene induziert (Tolhuis et al., 2002; Dean, 2006). Für die verschiedenen hypersensitiven Stellen (HS) konnten unterschiedliche Aufgaben während der transkriptionellen Aktivierung beschrieben werden. So erfolgt die β -Globin

Aktivierung in mehreren aufeinander folgenden Stufen, der Bildung des Präinitiationskomplexes, der Rekrutierung von RNA Polymerase II, spezifischen Aktivatoren (NF-E2) und allgemeinen Transkriptionsfaktoren an den Promotor und schließlich die LCR-abhängige Aktivierung der pausierenden Polymerase (Sawado et al., 2003). Für die HS2 bestehen darüber hinaus auch Hinweise auf eine Beteiligung an der Bildung des Präinitiationskomplexes (Bottardi et al., 2005; Levings et al., 2006). Diese Daten lassen vermuten, dass die LCR, und insbesondere die HS2, die Transkription durch Rekrutierung einzelner Präinitiationskomplex-Bestandteile verstärkt und die Bildung des Transkriptionsapparates am Promotor der Globin Gene verstärkt (Ross et al., 2009). Aus den Beobachtungen der in dieser Arbeit durchgeführten transgenen Analysen lassen sich ähnliche Aufgaben auch für den *Mrf4* 3kb Promotorbereich vermuten. Durch Deletion der Sequenz konnte der Nachweis erbracht werden, dass diese Region für die Vermittlung der selektiven Promotoraktivierung des EEEs essentiell ist. Es wurde zudem gezeigt, dass die Region keine allgemeine Fähigkeit zur Blockierung weiterer Enhancern oder Promotoren besitzt und somit spezifisch die Aktivierung des *Mrf4*-Promotors kontrolliert. Ausgehend von der Hypothese des Promotor-Stallings könnte diese Region an der Stabilisierung des pausierenden Polymerase-Komplexes am *Mrf4*-Promotor beteiligt sein. Die Deletion der 3kb Promotorregion würde die Destabilisierung des Komplexes und die Aktivierung der Polymerase zur Folge haben. Durch die Deletion des Bereiches im Transgen EE-6 konnte dieser Effekt experimentell gezeigt werden, was die potentiell stabilisierende Funktion unterstützen würde.

Der Nachweis pausierter PolII am *Mrf4*-Promotor, und damit die Bestätigung dieser möglichen Hypothese, kann durch Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit PolII-spezifischen Antikörper und nachfolgender qPCR erfolgen (Chopra et al., 2009 II). Durch eine derartige Arretierung der RNA-Polymerase II am *Mrf4*-Promotor könnte die Regulation von *Mrf4* gesteuert werden, bis der Promotor durch die Rekrutierung aktivierender Transkriptionsfaktoren über den myotomalen Enhancer aktiviert wird. Die Reversibilität dieses Mechanismus durch erneute Bindung negativer Faktoren wie NELF und DSIF ermöglicht zudem das mehrphasige Expressionsmuster des *Mrf4*-Gens während der Embryonalentwicklung (Gilmour, 2009).

Literaturverzeichnis

- Aida M., Chen Y., Nakajima K., Yamaguchi Y., Wada T., Handa H. (2006). Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol Cell Biol* 26, 6094–6104
- Akbari O.S., Schiller B.J., Goetz S.E., Ho M.C., Bae E., Drewell R.A. (2007). The abdominal-B promoter tethering element mediates promoter-enhancer specificity at the *Drosophila* bithorax complex. *Fly* (Austin) 1, 337–339
- Akbari O.S., Bae E., Johnson H., Villaluz A., Wong D. and Drewell R.A. (2008). A novel promoter-tethering element regulates enhancer-driven gene expression at the bithorax complex in the *Drosophila* embryo. *Development* 135, 123–131
- Arnold H.H. and Braun T. (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48, 129–164
- Ausubel F. (1989). Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons, New York*
- Bajard L., Relaix F., Lagha M., Rocancourt D., Daubas P., Buckingham M. (2006). A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Dev.* 20, 2450–2464
- Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Hermann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan G.D., Becker P.B. and Renkawitz R. (2009). Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EmboJ* 28, 877–888
- Beauchamp J.R., Heslop L., Yu D.S., Tajbakhsh S., Kelly R.G., Wernig A., Buckingham M.E., Partridge T.A., Zammit P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol.* 151, 1221–1234
- Bell A.C. and Felsenfeld G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 191–198
- Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity in vertebrate insulators. *Cell* 98, 387–396
- Belozerov V.E., Majumder P., Shen P., Cai H.N. (2003). A novel boundary element may facilitate independent gene regulation in the Antennapedia complex of *Drosophila*. *Embo J* 22, 3113–3121

- Ben-Yair R. and Kalcheim C. (2005). Lineage analysis of the avian dermomyotome reveals the existence of bipotent progenitors with dermal and mitotic muscle progenitor fates. *Development* 132, 689–701
- Bevilacqua A., Fiorenza M.T., Mangia F. (2000). A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Sp1 are required for transcription of the hsp70.1 gene at the onset of mouse zygotic genome activation. *Development* 127, 1541–1551
- Birnboim F., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res* 7, 1512–1523
- Black B.L., Martin J.F. und Olson E.N. (1995). The Mouse MRF4 Promoter Is *trans*-Activated Directly and Indirectly by Muscle-specific Transcription Factors. *JBC* 270, 2889–2892
- Blackwell T.K. and Weintraub H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104–1110
- Bober E., Lyons G.E., Braun T., Cossu G., Buckingham M., Arnold H.H. (1991). The muscle regulatory gene, *Myf-6*, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.* 113, 1255–1265
- Bober E., Franz T., Arnold H.H. Gruss P. und Tremblay P. (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 120, 603–612
- Boettiger A.N. and Levine M. (2009). Synchronous and stochastic patterns of gene activation in the Drosophila embryo. *Science* 325, 471–473
- Borello U., Berarducci B., Murphy P., Bajard L., Buffa V., Piccolo S., Buckingham M., Cossu G. (2006). The Wnt/ β -catenin pathway regulates Gli-mediated *Myf5* expression during somitogenesis. *Development* 133, 3723–3732
- Borycki A.G., Brunk B. Tajbakhsh S., Buckingham M., Chiang C. and Emerson Jr. C.P. (1999). Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through *Myf5* activation. *Development* 126, 4053–4063
- Bottardi S., Bourgin V., Pierre-Charles V., Milot E. (2005). Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells. *Hum. Mol. Genet.* 14, 493–502

- Braun T., Buschhausen-Denker G., Bober E., Tannich E., Arnold H.H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8, 701–709
- Braun T., Bober E., Winter B., Rosenthal N., Arnold H.H. (1990). *Myf6*, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 9, 821–831
- Braun T., Rudnicki M.A., Arnold H.H., Jaenisch R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369–382
- Braun T. and Arnold H.H. (1995). Inactivation of *Myf-6* and *Myf-5* genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J* 14, 1176–1186
- Brent A.E. and Tabin C.J. (2002). Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 548–557
- Bruce A.E.E., Oates A.C., Prince V.E. and Ho R.K. (2001). Additional hox clusters in the zebrafish: Divergent expression patterns belie equivalent activities of duplicate hoxB5 genes. *Evol. Dev.* 3, 127–144
- Buchberger A., Nomokonova N., Arnold H.H. (2003). *Myf5* expression in somites and limb buds of mouse embryos is controlled by two distinct distal enhancer activities. *Development* 130, 3297–3307
- Buchberger A., Freitag D., Arnold H.H. (2007). A homeo-paired domain-binding motif directs *Myf5* expression in progenitor cells of limb muscle. *Development* 134, 1171–1180
- Buckingham M., Bajard L., Chang T., Daubas P., Hadchouel J., Meilhac S., Montarras D., Rocancourt D und Relaix F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat* 202, 59–68
- Buckingham M. und Relaix F. (2007). The Role of *Pax* Genes in the Development of Tissues and Organs: *Pax3* and *Pax7* Regulate Muscle Progenitor Cell Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 645–673
- Bulger M. and Groudine M. (2002). TRAPping enhancer function. *Nature Genetics* 32, 555–556
- Burke T.W., Kadonaga J.T. (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes & Dev* 10, 711–724

- Bushey A.M., Dorman E.R. and Corces V.G. (2008). Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell* 32 (1), 1–9
- Bushey A.M., Ramos E., Corces V.G. (2009). Three subclasses of a *Drosophila* insulator show distinct and cell type-specific genomic distributions. *Genes Dev* 23, 1338–1350
- Butler J.E.F. and Kadonaga J.T. (2001). Enhancer–promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev.* 15, 2515–2519
- Butler J.E.F. and Kadonaga J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Dev.* 16, 2583–2592
- Cai S., Lee C.C., Kohwi-Shigematsu T. (2006). SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet* 38, 1278–88
- Calhoun V.C., Stathopoulos A., Levine M. (2002). Promoter–proximal tethering elements regulate enhancer–promoter specificity in the *Drosophila Antennapedia* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9243–9247
- Calhoun V.C. and Levine M. (2003). Long-range enhancer.promoter interactions in the *Scr–Antp* interval of the *Drosophila Antennapedia* complex. *PNAS* 100, 9878–9883
- Carter D., Chakalova L., Osborne C.S., Dai Y.F., Fraser P (2002). Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet.* 32, 623–626
- Carvajal J.J., Cos D., Summerbell D., Rigby P.W.J. (2001). A BAC transgenic analysis of the *Mrf4/Myf5* locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development* 128, 1857–1868
- Carvajal J.J., Keith A., Rigby P.W.J. (2008). Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes *Mrf4* and *Myf5*. *Genes & Dev.* 22, 265–276
- Chang T.H.–T., Primig M., Hadchouel J., Tajbakhsh S., Rocancourt D., Fernandez A., Kappler R., Scherthan H., Buckingham M. (2004). An enhancer directs expression of the linked *MRF4* and *Myf5* myogenic regulatory genes in the mouse. *Dev. Biol.* 269, 595–608

- Cheng B. and Price D.H. (2007). Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* 282, 21901–21912
- Choi O.R. and Engel J.D. (1988). Developmental regulation of beta-globin gene switching. *Cell* 55, 17–26
- Chopra V.S., Cande J., Hong J.-W. and Levine M. (2009). Stalled Hox promoters as chromosomal boundaries. *Genes Dev.* 23, 1505–1509
- Chopra V.S., Hong J.W., Levine M. (2009 II). Regulation of Hox Gene Activity by transcriptional elongation in Drosophila. *Current Biology* 19, 688–693
- Christ B., Jacob M., Jacob H.J. (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat. Embryol.* 166, 87–101
- Christ B. and Ohrdal C.P. (1995). Early stages of chick development. *Anat. Embryol.* 191, 381–396
- Christ B. and Brand-Saberi B. (2002). Limb muscle development. *International Journal of Developmental Biology* 46, 905–914
- Conte C., Dastugue B., Vaury C. (2002). Promoter competition as a mechanism of transcriptional interference mediated by retrotransposons. *EMBO J.* 21, 3908–3916
- Core L.J., Waterfall J.J., Lis J.T. (2008). Nascent RNA Sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845–1848
- Core L.J. and Lis J.T. (2009). Paused Pol II captures enhancer activity and acts as a potent insulator. *Genes Dev.* 23, 1606–1612
- Crossley M., Merika M., Orkin S.H. (1995) Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol* 15, 2448–2456
- Current Protocols in Molecular Biology (2006). *John Wiley & Sons, Inc.*
- Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000
- Dean A., (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet.* 22, 38–45

- Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science* 295, 1306–1311
- Dekker J. (2006). The three „C“s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls. *Nature Methods* 3, 17–21
- de Laat W. and Grosveld F. (2003). Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chrom. Res.* 11, 447–459
- de Souza F.S.J., Bumashny V.F., Low M.J. and Rubinstein M. (2005). Subfunctionalization of expression and peptide domains following the ancient duplication of the proopiomelanocortin gene in teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2417–2427
- Denetclaw W.F. Jr., Christ B., Ordahl C.P. (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* 124, 1601–1610
- Deng W., Roberts S.G. (2005). A core promoter element downstream of the TATA box is recognized by TFIIB. *Genes Dev.* 19, 2418–2423
- Deng W., Roberts S.G. (2007). TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Chromosoma* 116, 417–429
- Dietrich S., Abou-Rebyeh F., Brohmann H., Bladt F., Sonnenberg–Riethmacher E., Yamaai T., Lumsden A., Brand–Saber B. and Birchmeier C. (1999). The role of SF/HGF and c–Met in the development of skeletal muscle. *Development* 126, 1621–1629
- Drissen R., Palstra R.J., Gillemans N., Splinter E., Grosveld F., Philipsen S., de Laat W. (2004). The active spatial organization of the beta–globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev.* 18, 2485–90
- Dunn K.L., Zhao H., Davie J.R. (2003). The insulator protein CTCF associates with the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* 288, 218–223
- Dynan W.S. and Tjian R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence–specific DNA–binding proteins. *Nature* 316, 774–778
- Edmondson D.G. and Olson E.N. (1989). A gene with homology to the *myc* similarity region of *MyoD1* is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3, 628–640 [erratum (1990) *Genes Dev.* 4, 1450]
- El Hassan M.A. und Bremner R. (2009). A rapid simple approach to quantify chromosome conformation capture. *Nucleic Acids Res.* 37, No. 5, pp. e35–e35

- Felsenfeld G., Boyes J., Chung J., Clark D., Studitsky V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9384–9388
- Fomin M., Nomokonova N., Arnold H.H. (2004). Identification of a critical control element directing expression of the muscle-specific transcription factor MRF4 in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 272, 498–509
- Fomin M. (2005). Transcriptional regulation of MRF4 gene expression during embryonic mouse development. *Dissertation*
- Fraser P. (2006). Transcriptional control thrown for a loop. *Curr Opin Genet Dev* 16, 490–495
- Gazner M. and Felsenfeld G. (2008). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature* 455, 703–713
- Gerasimova T.I., Lei E.P., Bushey A.M., Corces V.G. (2007). Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Mol Cell* 28, 761–772
- Gershon T.J., Hsu J.-Y.H., Theisen J. W. M. and Kadonaga J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter – the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 253–259
- Gilmour D.S., Lis J.T. (1986). RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol* 6, 3984–3989
- Gilmour D.S. (2009). Promoter proximal pausing on genes in metazoans. *Chromosoma* 118, 1–10
- Goldberg M.L. (1979). Sequence Analysis of *Drosophila* Histone Genes. *Ph.D. thesis*, Stanford University
- Gros J., Manceau M., Thome V., Marcelle C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435, 954–958
- Guenther M.G., Levine S. S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 16–18
- Gurudatta B.V. and Corces V.G. (2009). Chromatin insulators: lessons from the fly. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 8(4), 276–282
- Gustafsson M.K., Pan H., Pinney D.F., Liu Y., Lewandowski A., Epstein D.F., Emerson Jr. C.P. (2002). *Myf5* is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev.* 16, 114–126

- Hadchouel J., Tajbakhsh S., Primig M., Chang T.H.-T., Daubas P., Rocancourt D. und Buckingham M. (2000). Modular long-range regulation of *Myf5* reveals unexpected heterogeneity between skeletal muscles in the mouse embryo. *Development* 127, 4455–4467
- Hadchouel J., Carvajal J.J., Daubas P., Bajard L., Chang T., Rocancourt D., Cox D., Summerbell D., Tajbakhsh S., Rigby P.W.J., Buckingham M. (2003). Analysis of key regulatory region upstream of the *Myf5* gene reveals multiple phases of myogenesis, orchestrated at each site by a combination of elements dispersed throughout the locus. *Development* 130, 3415–3426
- Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmondson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., Klein W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506
- Hatzis P., Talianidis I. (2002) Dynamics of enhancer–promoter communication during differentiation–induced gene activation. *Mol Cell* 10, 1467–1477
- Hendrix D.A., Hong J.W., Zeitlinger J., Rokhsar D.S. and Levine M.S. (2008). Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo. *PNAS* 105, 7762–7767
- Hogan B., Beddington R., Constantini F., Lacy E. (1994). Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press*
- Horike S., Cai S., Miyano M., Cheng J.F., Kohwi-Shigematsu T. (2005). Loss of silent–chromatin looping and impaired imprinting of *DLX5* in Rett syndrome. *Nat Genet* 37, 31–40
- Innan H., Kondrashov F. (2010). The evolution of gene duplications classifying and distinguishing between models. *Nat Rev Genet.* 11 (2), 97–108
- Jing H., Vakoc C.R., Ying L., Mandat S., Wang H., Zheng X. and Blobel G.A. (2008). Exchange of GATA Factors Mediates Transitions in Looped Chromatin Organization at a Developmentally Regulated Gene Locus. *Mol. Cell* 29, 232–242
- Juven–Gershon T., Hsu J.Y., Kadonaga J.T. (2008). Caudal, a key developmental regulator, is a DPE–specific transcriptional factor. *Genes & Dev* 22, 2823–2830
- Juven–Gershon T. and Kadonaga J.T. (2009). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev. Biol.* 339, 225–229
- Kadauke S. and Blobel G.A. (2009). Chromatin loops in gene regulation. *Biochim Biophys Acta.*, 1789 (1), 17–25

- Kassar-Duchossoy L., Gayraud-Morel B., Gomés D., Rocancourt D., Buckingham M., Shinin V., Tajbakhsh S. (2004) Mrf4 determines skeletal muscle identity in *Myf5:MyoD* double mutant mice. *Nature* 431, 466–471
- Kassar-Duchossoy L., Giacone E., Gayraud-Morel B., Jory A., Gomes D., Tajbakhsh S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes & Dev.* 19, 1426–1431
- Kellum R., Schedl P. (1992). A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol Cell Biol* 12, 2424–2431
- Kim S.I., Bresnick E.H., Bultman S.J. (2009). BRG1 directly regulates nucleosome structure and chromatin looping of the α globin locus to activate transcription. *Nuc. Acids Res.* 37, 6019–6027
- Kozak, M. (1991). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234(2), 187–208
- Kruger M., Mennerich D., Fees S., Schäfer R., Mundlos S., Braun T. (2001). Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development* 128, 743–752
- Kurukuti S., Tiwari V.K., Tavoosidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenko V., Reik W., Ohlsson R. (2006). CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10684–10689
- Labrador M., Corces V.G. (2002). Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell* 111, 151–154
- Lagrange T., Kapanidis A.N., Tang H., Reinberg D., Ebright R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & Dev.* 12, 34–44
- Levings P.P., Zhou Z., Vieira K.F., Cruselle-Davis V.J., Bungert J. (2006). Recruitment of transcription complexes to the beta-globin locus control-region and transcription of hypersensitive site 3 prior to erythroid differentiation of murine embryonic stem cells. *FEBS* 273, 746–755
- Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570

- Lewis B.A., Kim T.K., Orkin S.H. (2000). A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci* 97, 7172–7177
- Li Q., Barkess G., Qian H. (2006). Chromatin looping and the probability of transcription. *Trends in Genetics* 22, 197–22
- Lim C.Y., Santoso B., Boulay T., Dong E., Ohler U., Kadonaga J.T. (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes & Dev.* 18, 1606–1617
- Lin Q., Chen Q., Lin L., Smith S., Zhou J. (2007). Promoter targeting sequence mediates enhancer interference in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3237–3242
- Lindert U. (2005) Konstruktion und Klonierung von gewebsspezifisch regulierten MRF4/Myf5 Transgenen. *Diplomarbeit*
- Lis J. (1998). Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 347–356
- Liu Z. and Garrard W.T. (2005). Long-Range Interactions between Three Transcriptional Enhancers, Active V_k Gene Promoters, and a 3' Boundary Sequence Spanning 46 Kilobases. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3220–3231
- Locascio A., Manzanares M., Blanco M.J. and Nieto M.A. (2002). Modularity and reshuffling of Snail and Slug expression during vertebrate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16841–16846
- Lunyak V.V., Prefontaine G.G., Nunez E., Cramer T., Ju B-G., Ohgi A.K., Hutt K., Roy R., Garcia-Diaz A., Zhu X., Yung Y., Montoliu L., Glass C.K., Rosenfeld G. (2007). Developmentally regulated activation of a SINE B2 Repeat as a domain boundary in organogenesis. *Science* 317, 248–251
- Maeda R.K. and Karch F. (2009). The Bithorax Complex of *Drosophila*: An Exceptional *Hox* Cluster. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88, 1–33
- Mahmoudi T, Katsani KR, Verrijzer CP (2002). GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules. *Embo J* 21, 1775–81
- Marenduzzo D., Faro-Trindade I., Cook P.R. (2007). What are the molecular ties that maintain genomic loops? *Trends Genet* 23, 126–133
- McPherson M.J., Hames B.D., Tayler G.R. (1991). PCR: A laboratory Approach. *IRL Press at Oxford University Press*

- Miele A., Gheldof N., Tabuchi T.M., Dostie J and Dekker J. (2006). Mapping Chromatin Interactions by Chromosome Conformation Capture. *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit 21.11
- Miele A. and Dekker J. (2008). Long-range chromosomal interactions and gene-regulation. *Mol. BioSyst.* 4, 1046–1057
- Miner J.H. and Wold B. (1990). *Herculin*, a fourth member of the *MyoD* family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1089–1093
- Mohan M., Bartkuhn M, Herold M, Philippen A., Heintz N., Bardenhagen I., Leers J., White R. A. H., Renkawitz-Pohl R., Saumweber H. and Renkawitz R. (2007). The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *Embo J* 26, 4203–4214
- Murrell A., Heeson S., Reik W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet* 36, 889–893
- Muse G.W., Gilchrist D.A., Nechaev S., Shah R., Parker J.S., Grissom S.F., Zeitlinger J., Adelman K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* 39, 1507–1511
- Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Li S., Nonaka I., Nabeshima Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532–535
- Nechaev S. and Adelman K. (2008). Promoter-proximal PolIII: When stalling speeds things up. *Cell Cycle* 7, 1539–1544
- Nikolaev L.G., Akpov S.B., Didych D.A., Sverdlov E.D. (2009). Vertebrate protein CTCF and its multiple roles in a large-scale regulation of genome activity. *Curr. Genomics* 10, 294–302
- Nolis I.K., McKay D.J., Mantouvalou E., Lomvardas S., Merika M., Thanos D. (2009). Transcription factors mediate long-range enhancer promoter interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20222–20227
- Ohtsuki S., Levine M., Chai H.N. (1998). Different core promoters possess distinct regulatory activities in the *Drosophila* embryo. *Genes & Dev.* 12, 547–556
- Ott M.O., Bober E., Lyons G., Arnold H.H., Buckingham M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111, 1097–1107

- Palstra R.J., Tolhuis B, Splinter E., Nifmeijer R., Grosveld F., de Laat W. (2003). The β -globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat. Genet.* 35, 190–194
- Palstra R.J., de Laat W., Grosveld F. (2008). Beta-globin regulation and long-range interactions. *Adv. Genet.* 61, 107–142
- Patapoutian A., Miner J.H., Lyons G., Wold B. (1993). Isolated sequences from the linked Myf5 and MRF4 genes drive distinct patterns of muscle-specific expression in transgenic mice. *Development* 118, 61–69
- Petrascheck M, Escher D, Mahmoudi T, Verrijzer CP, Schaffner W, Barberis A (2005). DNA looping induced by a transcriptional enhancer in vivo. *Nucleic Acids Res* 33, 3743–50
- Price D.H. (2008). Poised Polymerases: On your mark...get set...go! *Mol. Cell* 30, 7–10
- Rawls A., Valdez M.R., Zhang W. (1998). Overlapping function of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* 125, 2349–2358
- Relaix F., Rocancourt D., Mansouri A., Buckingham M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953
- Reznikoff C.A., Brankow D.W., Heidelberger C. (1973). Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence inhibition of Division. *Cancer Res.* 33, 3231–3238
- Rhodes S.J. and Konieczny S.F. (1989). Identification of *MRF4*: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3, 2050–2061
- Ronshaugen M. and Levine M. (2004). Visualization of *trans*-Homolog Enhancer-Promoter Interactions at the *Abd-B* Hox Locus in the *Drosophila* Embryo. *Dev. Cell* 7, 925–932
- Ross J., Bottardi S., Bourgoin V., Wollenschlaeger A., Drobetsky E., Trudel M., Milot E. (2009). Differential requirement of a distal regulatory region for pre-initiation complex formation at globin gene promoters. *Nucleic Acids Res* 37(16), 5295–5308
- Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S., Jaenisch R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71, 383–390

- Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N., Stead R.H., Braun T., Arnold H.H., Jaenisch R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359
- Sambrock J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning – A Laboratory Manual *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467
- Saunders A., Core L.J. and Lis J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 557-567
- Sawado T., Halow J., Bender M.A., Groudine M. (2003). The β -globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation. *Genes Dev.* 17, 1009-1018
- Schäfer K., Braun T. (1999). Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1h*. *Nat. Genet.* 23, 213-216
- Sipos L, Mihaly J, Karch F, Schedl P, Gausz J & Gyurkovics H (1998) Transvection in the *Drosophila* Abd-B domain: extensive upstream sequences are involved in anchoring distant cis-regulatory regions to the promoter. *Genetics* 149, 1031-1050
- Smale S.T., Baltimore D. (1989). The „Initiator“ as a transcriptional control element. *Cell* 57, 103-113
- Smale S.T. and Kadonaga J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449-479
- Spana C., Harrison D.A., Corces V.G. (1998). The *Drosophila melanogaster* suppressor of Hairy-wing protein binds to specific sequences of the gypsy retrotransposon. *Genes Dev* 2, 1414-1423
- Spilianakis G.C. und Flavell R.A. (2004). Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat. Immunol.* 5, 1017-1027
- Summerbell D., Ashby P.R., Coutelle O., Cox D., Yee S-P., Rigby P.W.J. (2000). The expression of *Myf5* in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development* 127, 3745-3757

- Summerbell D., Halai C., Rigby P.W.J. (2002). Expression of the myogenic regulatory factor *Mrf4* precedes or is contemporaneous with that of *Myf5* in the somitic bud. *Mech. Dev.* 117, 331–335
- Sun F.L. and Elgin S.C. (1999). Putting boundaries on silence. *Cell* 99, 459–462
- Tajbakhsh S., Bober E., Babinet C., Pournin S., Arnold H.H. Buckingham M. (1996). Gene targeting of the *myf-5* locus with *nlacZ* reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev. Dyn.* 206, 291–300
- Tajbakhsh S., Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: *Pax-3* and *myf-5* act upstream of *MyoD*. *Cell* 89, 127–138
- Tajbakhsh S. and Buckingham M. (2000). The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48, 225–268
- Teboul L., Hadchouel J., Daubas P., Summerbell D., Buckingham M., Rigby P.W.J. (2002). The early epaxial enhancer is essential for the initial expression of the skeletal muscle determination gene *Myf5* but not for subsequent, multiple phases of somitic myogenesis. *Development* 129, 4571–4580
- Teboul L., Summerbell D., Rigby P.W.J. (2003). The initial phase of *Myf5* expression requires neither *Shh* signaling nor *Gli* regulation. *Genes Dev.* 17, 2870–2874
- Tolhuis B., Palstra R.J., Splinter E., Grosveld F. & de Laat, W. (2002). Looping and interaction between hypersensitive sites in the active β -*globin* locus. *Mol. Cell* 10, 1453–1465
- Udvardy A., Maine E., Schedl P. (1985). The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J. Mol. Biol.* 185, 341–358
- Vakoc C.R., Letting D.L., Gheldof N., Sawado T., Bender M.A., Groudine M., Weiss M.J., Dekker J. und Blobel G.A. (2005). Proximity among Distant Regulatory Elements at the β -Globin Locus Requires GATA-1 and FOG-1. *Mol. Cell* 17, 453–462
- Venters S.J., Thorsteinsdóttir S., Duxson M.J. (1999). Early Development of the Myotome in the Mouse. *Dev. Dynamics* 216, 219–232

- Venuti J.M., Morris J.H., Vivian J.L., Olson E.N., Klein W.H. (1995). Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell. Biol.* 128, 563–576
- Vernimmen D., De Gobbi M., Sloane–Stanley J., Wood W.G., Higgs D.R. (2007) Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *The EMBO Journal* 26, 2041–2051
- Wallace J.A. and Felsenfeld G. (2007). We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev.* 17, 400–407
- Wang Q., Carroll J.S. and Brown M. (2005). Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol Cell* 19, 631–642
- West A.G., Gaszner M. Felsenfeld G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes & Dev.* 16, 271–288
- West A.G. and Fraser P. (2005). Remote control of gene transcription. *Hum. Mol. Genet.* 14, R101–R111
- Wright M.B., Hugo C., Seifert R., Distech C.M., Bowen–Pope D.F. (1998). Proliferating and migrating mesangial cells responding to injury express a novel receptor protein–tyrosine phosphatase in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Biol. Chem.* 273, 23929–23937
- Wright W.E., Sassoon D.A., Lin V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607–617
- Wu C.H., Yamaguchi Y., Benjamin L.R., Horvat–Gordon M., Washinsky J., Enerly E., Larsson J., Lambertsson A., Handa H., Gilmour D. (2003). NELF and DSIF cause promoter proximal stalling on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev.* 17, 1402–1414
- Wu J.Q. and Snyder M. (2008). RNA polymerase II stalling: loading at the start prepares genes for a sprint. *Genome Biol* 9(5), 220
- Wurtele H., Chartrand P. (2006). Genome-wide scanning of HoxB1-associated loci in mouse ES cells using an open-ended Chromosome Conformation Capture methodology. *Chromosome Res* 14, 477–495
- Yamaguchi Y., Inukai N., Narita T., Wada T., Handa H. (2002). Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol. Cell Biol.* 22, 2918–2927

- Yoon H. and Donahue T.F. (1992). Control of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6, 1413–1419
- Yoon Y.S., Jeong S., Rong Q., Park K.Y., Chung J.H., Pfeifer K. (2007). Analysis of the H19ICR insulator. *Mol Cell Biol* 27, 3499–3510
- Zammit P.S., Carvajal J.J., Golding J.P., Morgan J.E., Summerbell D., Zolnerciks J, Partridge T.A., Rigby P.W.J. and Beauchamp J.R. (2004). *Myf5* expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Dev. Biol.* 273, 454–465
- Zeitlinger J., Stark A., Kellis M., Hong J.W., Nachaev S., Adelman K., Levine M., Young R.A. (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila* embryo. *Nat Genet.* 39 (12), 1512–1516
- Zhao K., Hart C.M., Laemmli U.K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* 81, 879–889
- Zweigerdt R., Braun T. und Arnold H.H. (1997). Faithful expression of the *Myf-5* gene during mouse myogenesis requires distant control regions: a transgene approach using yeast artificial chromosomes. *Dev. Biol.* 192, 172–180

Anhang

Nukleotid-Sequenz des Mrf4-Promotors

ATTAATGAGGCTATTTTGGAGCAATGGCTATTGCCTATGAAATCTCTCATCATGAGTC
TATACTTAGAATTCAGTTGAACTCTGGAGGGAGGGGAGCAGAGCAGTGTTAATCCCC
AGTTGTTTTTGAAGTTGCCTGGTTAGCAGGTTAGTGTCGGAAGTGTCCAAAATGGAAG
CACCGAATGCTTTCGGCACTGTGACTATCTGTGTGTATTTTGTTTTAACTGTTTGT
CTTATGGACGGTCACATTCAGTCTCAGAGGTGATATTTCTCCGTTTTCTTCAAATA
GATGTTCTAGGGAGCGCTCGCTGTAATCACTTTGGGAGACTGATGCTCCATGACAGCT
AGAAGTTGGATTGAGTTTCAGTAGCTACTATATATAAAGCTGGGTCGACTTATGTCAC
CGCACTAATTAATGCCATCTGGGTGGCTCCTCTGGGTTTTTGAGTCCATCACCCAGA
TCAGATCAGTCAGAGGCCAAGGAGGAGAACATGATGATGGACCTTTTTGAACTGGC
TCCTATTTCTTCTACTTAGATGGAGAAAATGTGACTCTTCAGCCATTAGAAGTGGCAG
AGGGCTCTCCTTTGTATCCAGGGAGTGATGGTACC

Nukleotid-Sequenz des Myf5-Promotors

TCTAGAAGAAAGACAAGAGGCTTGCCCAGACAGCCCCTGTGGGGGGTTGTGGTGGA
TATGCTAATAACGCCCAGCTACAGGGACCAACCTCCCTTCCCATCCCCCAGGAATAT
ATAAAGAGCCCCAACCTCAGCCACTGACCGACCCTGGCCAACAGGCATCTGTCTTG
TTAATTACAGAGAGACAGTCCCAAACCTCCGGGAGCTCCGCCTGGATTTGCTGGCCTG
CAGCAGCCAGGGACTGGCGTGTCTCCCTCTCTGCTGAATCCAGGTATTCCCACCTGC
TTCTCTGAAGGATGACATGACGGACGGCTGCCAGTTCTCCCCTTCTGAGTACTTC

Nukleotid-Sequenz des hsp70-Promotors

CTTAGTAATGCGTCGCCATAGCAACAGTGTCAGTAGCACCAGCACTTCCCCACA
CCCTCCCCCTCAGGAATCCGTACTCTCCAGTGAACCCAGAAACCTCTGGAGAGTTC
TGGACAAGGGCGGAACCCACAACCTCCGATTACTCAAGGGAGGCGGGGAAGCTCCACC
AGACGCGAAACTGCTGGAAGATTCTGGCCCCAAGGCCTCCTCCGGCTCGCTATTG
GCCAGCGAGAGTGGCGGGCCGGTGAAGACTCCTTAAAGGCGCAGGGCGGCGA
GCAGGTCACCAGACGCTGACAGCTACTCAGAACCAATCTGGTTCCATCCAGAGACA
AGCGAAGACAAGAGAAGCAGAGCGAGCGCGGTTCCCGATCCTCGGCCAGGACCA

GCCTTCCCCAGAGCATCCCTGCCGCGGAGCGCAACCTTCCCAGGAGCATCCCTGCCG
CGGAGCGCAACTTTCCCCGGAGCATCCACGCCGCGGAGCGCAGCCTTCCAGAAGCAG
AGCGCGGCGCCATGGGGGATCC

rot: CCAAT Box

blau: GAGAG

grün: GC Box

Nukleotidsequenz des TK-Promotors

AGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCGGTGGTTAGGGTTTG
TCTGACGCGGGGGGAGGGGGAAGGAACGAAACACTCTCATTTCGGAGGCGGCTCGGG
GTTTGGTCTTGGTGGCCACGGGCACGCAGAAGAGCGCCGCGATCCTCTTAAGCACCC
CCCCGCCCTCCGTGGAGGCGGGGTTTGGTCCGCGGGTGGTAACTGGCGGGCCGCTG
ACTCGGGCGGGTCCGCGCGCCCCAGAGTGTGACCTTTTCGGTCTGCTCCGAGACCCCC
GGGCGGCGCCGCGCGGGCGGCGACGGGCTCGCTGGGTCTAGGCTCCATGGGGACC
GTATACGTGGACAGGCTCTGGAGCATCCGCACGACTGCGGTGATATTACCGGAGACC
TTCTGCGGGACGAGCCGGGTACGCGGCTGACGCGGAGCGTCCGTTGGGCGACAAAC
ACCAGGACGGGGCACAGGTACACTATCTTGTCACCCGGAGGCGCGAGGGACTGCAGG
AGCTTCAGGGAGTGGCGCAGCTGCTTCATCCCCGTGGCCCGTTGCTCGCGTTTGCTG
GCGGTGTCCCCGGAAGAAATATATTTGCATGTCTTTAGTTCTATGATGACACAAACCC
CGCCCAGCGTCTTGTCATTGGCGAATTGGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGGCGG
GTCCCAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGAC
CCTGCAGCGACCCGCTTAAAGCT

Nukleotidsequenz eines sequenzierten 3C-Fragmentes

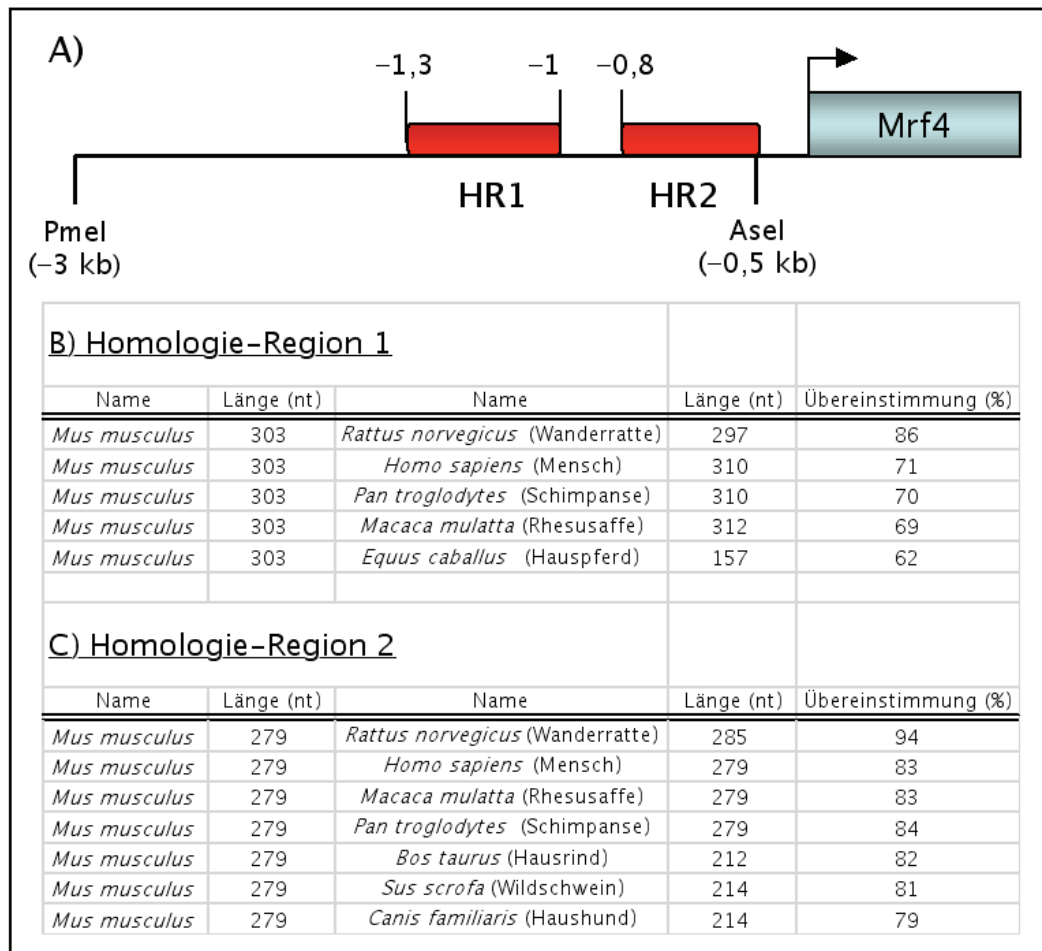
GGTGAAGAGCGCTTGGTACAAACATCAGTTACTGTGTTGGTAATCTCTACCAGGTATA
AATTGAGATGAGAGTAAGAACTGTAGGAGGGAGACGTGTTTTAGACAGGACAACCTGT
ATCATGA^{AAATGAGAAGCAAGCACCGGAGATCCGTGCGTTAAGAATCCAGAAGCTAG}
GTTC

rot: -56/-58 kb Enhancer

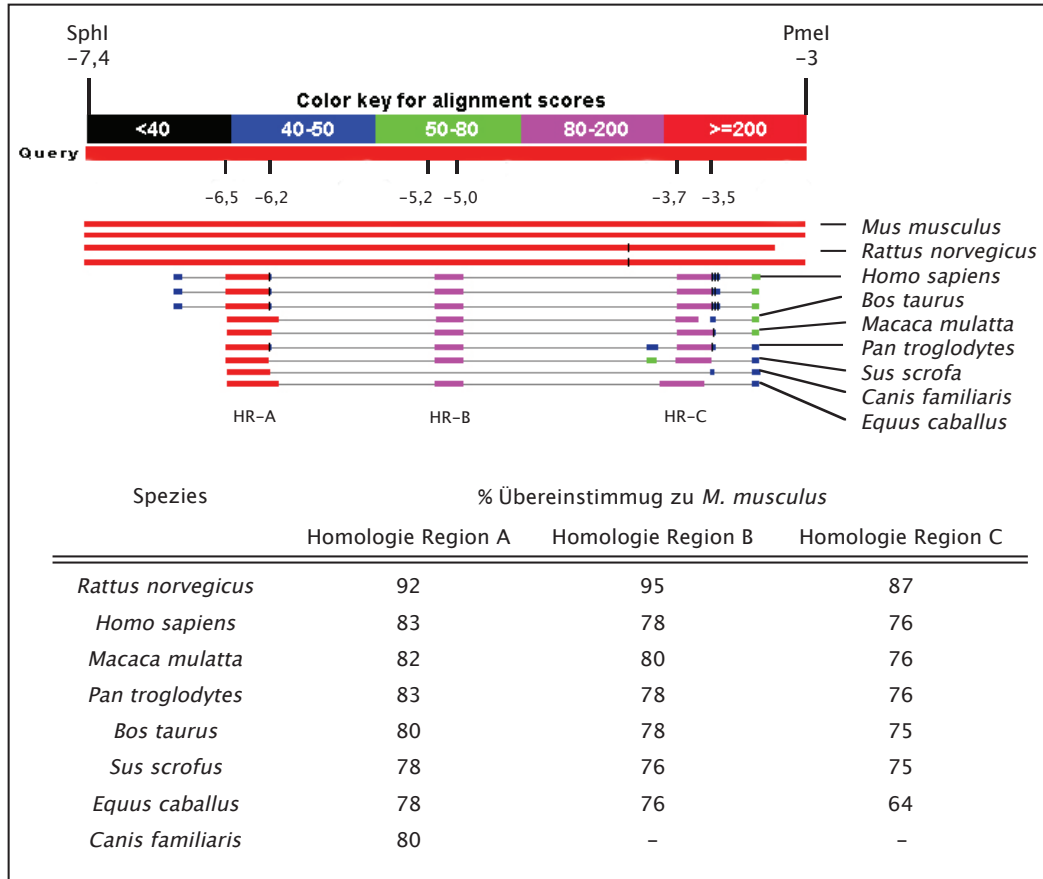
fett: BspHI-Schnittstelle

blau: Myf5-Promotor

Sequenzvergleich der murinen -3/-0,5 kb Region mit verschiedenen Mammalia-Spezies



Sequenzvergleich der murinen -7,4/-3 kb Region mit verschiedenen Mammalia-Spezies



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Mentor Prof. Dr. Hans-Henning Arnold danke ich für das interessante Thema und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Korte danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Klaus Schughart danke ich für die Teilnahme an der Prüfungskommission und das Vertrauen in meine Person.

Ein großes Dankeschön gebührt Dr. Astrid Buchberger, die mich durch ihre ungebrochene Unterstützung auf dem Weg der Forschung geleitet hat. Darüber hinaus sei ihr ganz herzlich für die Durchführung der Pronukleusinjektionen gedankt.

Für die kurzweilige Zeit im Labor danke ich meinen Kolleginnen Franziska Resch und Iris Linde. Ferner natürlich auch allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zell- und Molekularbiologie, Dr. Barbara Winter, Dr. Franz Vauti, Dr. Andreas Holz, Ines Lahmann, Dr. Bomi Jung, Alexandra Wolf und allen, die hier aus Platzgründen nicht genannt werden können, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Unterstützung während und abseits des Forscheralltags.

Ein besonderes Dankeschön geht an Friederike Kruse für die großartige Durchführung der Pronukleusinjektionen.

Danke möchte ich auch Charlotte Klaue für die Unterstützung im Kampf gegen die Bürokratie sagen.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern, die mir ermöglicht haben, diesen Weg zu bestreiten.

Der wichtigste und persönlichste Dank gilt meiner Frau, Hilke Hatesuer, die während dieser Zeit ihren bedingungslosen Rückhalt, ihre Liebe und ihre unermessliche Geduld bewiesen hat.